UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
GRIGORE T. POPA IAȘI

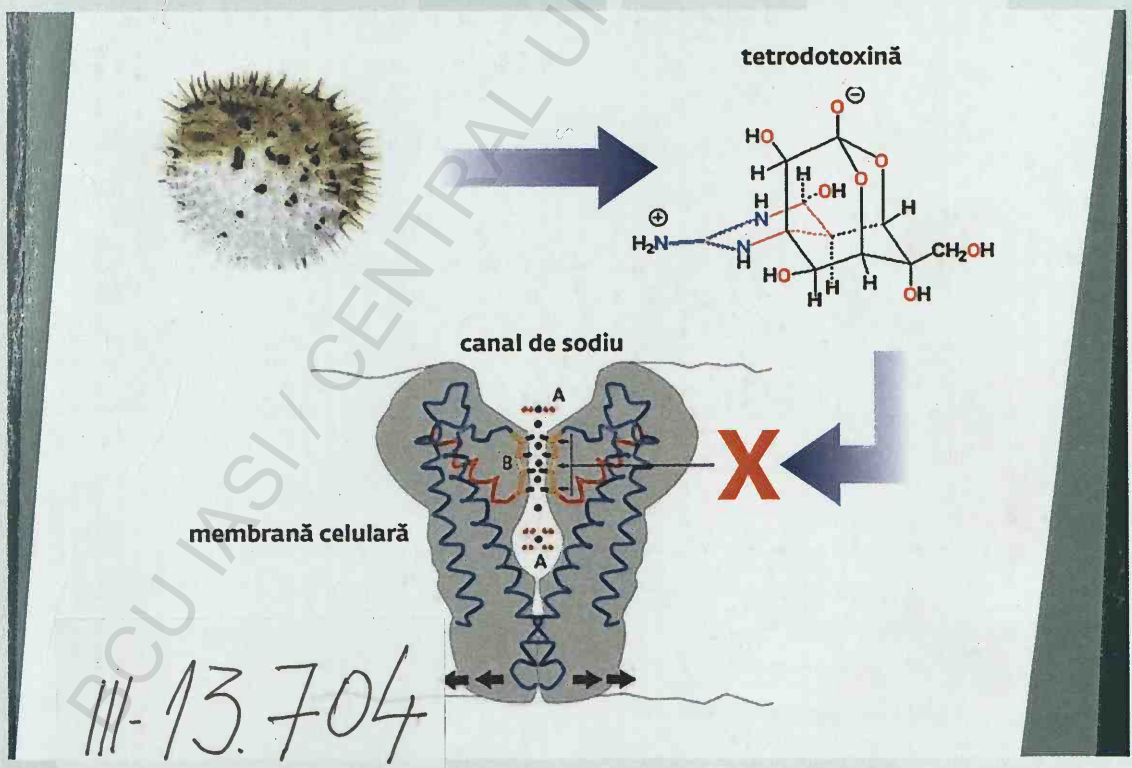
NOTE de CURS

FACULTATEA DE MEDICINĂ

Cipriana ȘTEFĂNESCU
Valeriu RUSU
Irena GRIEROSU

Biofizica pas cu pas:

O introducere în Biofizică şi Fizică medicală



III-13.704

Editura „Gr. T. Popa", U.M.F. Iași

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

M-13704

880687

Cipriana Ştefănescu, Valeriu Rusu,
Irena Grierosu

BIOFIZICA PAS CU PAS

O INTRODUCERE IN BIOFIZICĂ ŞI FIZICĂ MEDICALĂ

(Fascicula I)

0 000008 70694 BCU IAŞI

Editura „Grigore T. Popa", U.M.F. Iaşi
2021

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
ŞTEFĂNESCU, CIPRIANA
Biofizica pas cu pas : o introducere în Biofizică şi Fizică medicală / Cipriana Ştefănescu, Valeriu Rusu, Irena Grierosu. - Iaşi : Editura Gr.T. Popa, 2021
Conţine bibliografie
ISBN 978-606-544-746-2

I. Rusu, Valeriu
II. Grierosu, Irena Cristina

57

Referenţi ştiinţifici:
Prof. Dr. Ionela-Lăcrămioara Şerban
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Grigore T. Popa" Iaşi
Prof. Dr. Mihaela Baican
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Grigore T. Popa" Iaşi

Layout coperta: Doru Hobjilă

Editura „Gr. T. Popa"
Universitatea de Medicină şi Farmacie Iaşi
Str. Universităţii nr. 16

Editura „Gr. T. Popa"este acreditată de CNCSIS - Consiliul Naţional al Cercetării Ştiinţifice din Învăţământul Superior

Toate drepturile asupra acestei lucrări aparţin autorilor şi Editurii „Gr. T. Popa" Iaşi. Nici o parte din acest volum nu poate fi copiată sau transmisă prin nici un mijloc, electronic sau mecanic, inclusiv fotocopiere, fără permisiunea scrisă din partea autorilor sau a editurii.

Tiparul executat la Tipografia Universităţii de Medicină şi Farmacie
"Grigore T. Popa" Iaşi
str. Universităţii nr. 16, cod. 700115, Tel. 0232 30167

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuvânt înainte

De obicei ***Biofizica*** este considerată studiul sistemelor vii în termenii conceptelor și legilor ***Fizicii.*** Nu este greu să observăm că este un subiect interdisciplinar. La cel mai simplu nivel, se constată că putem aplica ***Fizica*** în înțelegerea funcționării sistemelor de organe; aceste aspecte sunt în relație cu domeniul fiziologiei. La nivelul următor, ***Biofizica***, încearcă să înțeleagă structura și dinamica celulelor și a moleculelor. Acest aspect este în relație cu studiul ***Biologiei moleculare*** și al ***Biochimiei.***

În realitate, evoluția biofizicii arată că studiul fenomenului vieții este mult mai complex. ***Erwin Schrodinger*** a definit viața (în *"Ce este viața?"*) ca *"o insulă antientropică în oceanul entropic"*, afirmând că la nivelul structurilor vii există legi pe care ***Fizica*** nu le-a descoperit încă. De asemenea, unele metode și tehnici ale ***Fizicii,*** nu pot fi, de obicei, utilizate în studiul biosistemelor fără a fi modificate. Acestea trebuie să fie adaptate, fiind necesare tehnici de pregătire adecvate pentru fragilele țesuturi vii. Pe de altă parte, unele proprietăți fizice nu pot fi găsite astfel în structurile vii.

Subiectul acestei cărți se adresează în primul rând studenților la ***Medicină***, având scopul de a constitui o bază și un fundament pentru înțelegerea ulterioară a bolilor. Textul este o traducere, în mare parte revăzută și adăugită - lucru inevitabil necesar într-un domeniu atât de dinamic cum este ***Biofizica*** și care justifică și adăugarea încă unui autor - după *Biophysics and medical Physics: an Introduction.* Cipriana Ștefănescu, Valeriu Rusu, 2008, Editura Technopress, Iași.

Este o sarcină dificilă să se prezinte subiecte complexe în cuvinte simple și familiale. Pentru studenții din primul an de ***Medicină*** este chiar și mai dificil de explicat de ce au nevoie și de ***legi ale fizicii*** pentru a înțelege ***Medicina***, de ce ar putea să regrete, în următorii ani de facultate, în fața pacientului și a bolii, faptul că nu au înțeles de la început un anumit fenomen biofizic de bază, care ar putea explica semnele și simptomele clinice sau reacția la tratamentul aplicat. Acesta este motivul pentru care aceste pagini conțin schița pentru o discuție despre elemente ***Biofizice*** și despre aplicațiile lor medicale, dar nu pretind că reprezintă o monografie completă a acestor subiecte. O parte dintre subiectele prezentate trebuie completate cu informații cuprinse în cartea de *Lucrări practice și demonstrații de Biofizică și Fizică medicală* precum și cu *explicațiile de la curs,* care aduc și ultimile noutăți în domeniu.

Ne dorim că aceste pagini să ajute la dezvoltarea gândirii logice, atât de necesară unui medic bun profesionist și să constituie punctul de plecare pentru dorința de a afla mai multe lucruri în relație cu subiectele prezentate și cu aplicațiile lor medicale.

Sperăm, de asemenea, că acestea ar putea fi utile pentru aceia, studenți la medicină și nu numai, care au nevoie de o scurtă introducere în înțelegerea acestor subiecte.

Autorii

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

I. INTRODUCERE 1

I.1. Rolul fizicii în evoluția medicinei - exemple 1
I.2. Definiția și evoluția biofizicii 2
I.3. Biofizica – știință de frontieră 4
I.4. Clasificarea domeniilor de studiu ale biofizicii 5
I.5. Biofizica medicală: trei direcții de evoluție 6

II. TEORIA SISTEMELOR ÎN BIOLOGIE ȘI MEDICINĂ 11

II.1. Semnificația și delimitarea noțiunii de sistem 11
II.2. Clasificarea sistemelor 12
II.3. Caracteristicile generale ale sistemelor biologice 14
II.4. Condiții și moduri de abordare în studiul sistemelor 15
II.5. Termodinamica biologică 16
II.6. Cibernetica și biocibernetica 19
II.7. Sisteme complexe 21
II.8. Complexitate și haos în biosisteme 24
II.9. Ce este viața? 25

III. SISTEME MODEL: MODELAREA ÎN CERCETAREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI ÎN PRACTICA MEDICALĂ 28

III.1. Modelul științific și modelarea științifică – definiții și tendințe în medicină 28
III.2. Etapele modelării: modelul Hodgkin – Huxley pentru transmiterea influxului nervos la nivelul axonului 29
III.3. Clasificarea modelelor 32
III.4. Modelarea teoretică, structurală și funcțională 33
III.5. Modelarea *in silico*. Celula virtuală 37
III.6. Biosenzori 39
III.7. Tendințe în modelarea protetică 44
III.8. Biomateriale și biocompatibilitate 48
III.9. Modele biologice 50
III.10. Nanotehnologie, nanobiofizică, nanomedicină 55

BUAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV. METODE ŞI TEHNICI FIZICE ŞI BIOFIZICE ÎN MEDICINĂ 65

IV.1. Metode generale şi instrumentale: clasificare, caracteristici generale 66
IV.2. Tehnici cromatografice 69
IV.2.1. Clasificare în relaţie cu principiul metodei 69
IV.2.2. Cromatografia de afinitate 71
IV.3. Tehnici de centrifugare 74
IV.3.1. Principiul metodei 74
IV.3.2. Clasificarea tehnicilor de centrifugare 76
IV.4. Etape în fracţionarea unui eşantion subcelular 79
IV.5. Liofilizarea 81
IV.6. Tehnici de microscopie optică 84
IV.7. Tehnici de microscopie electronică 98
IV.7.1. Principiul fizic al microscopiei electronice 98
IV.7.2. Interacţiunea unui fascicul de electroni cu preparatul 101
IV.7.3. Componentele principale ale microscopului electronic 104
IV.7.4. Microscopia electronică de transmisie 107
IV.7.5. Microscopia electronică cu baleiaj 108
IV.7.6. Tehnici în relaţie cu microscopia electronică 110
IV.8. Difracţia cu raze X 111
IV.9. Tehnici spectroscopice cu utilitate medicală 117
IV.9.1. Principiul fizic şi clasificarea tehnicilor spectroscopice 117
IV.9.2. Spectre de tranziţie electronică 120
IV.9.3. Spectrometria de microunde (spectre de rotaţie) 123
IV.9.4. Spectrometria în infraroşu şi Raman (spectre de vibraţie - rotaţie) 123

V. ASPECTE BIOFIZICE ALE MACROMOLECULELOR 125

V.1. Macromoleculele: caracteristici generale în biosisteme 125
V.2. Caracteristici biofizice ale structurilor proteice 127
V.3. Aspecte biofizice ale structurii acizilor nucleici 135

VI. BIOFIZICA APEI 140

VI.1. Molecula de apă 140
VI.2. Structura apei: gheaţa şi apa lichidă 141
VI.3. Proprietăţile apei şi particularităţile acestora 143
VI.4. Distribuţia apei în organismul viu 146
VI.5. Disocierea apei 147

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII. BIOFIZICA BIOMEMBRANELOR 149

VII.1. Biomembrane: definiție, tipuri, roluri esențiale 151
VII.2. Compoziția biomembranei și caracteristicile biofizice ale moleculelor 153
VII.2.1. Lipide membranare 154
VII.2.1.1. Compoziție generală; proprietăți biofizice 154
VII.2.1.2. Organizarea lipidelor: conceptul de bistrat lipidic 156
VII.2.1.3. Fluiditatea membranară (microviscozitatea) 158
VII.2.2. Proteine membranare 161
VII.2.2.1. Compoziție generală; proprietăți biofizice 161
VII.2.2.2. Organizarea proteinelor: dispoziția în bistratul lipidic 161
VII.3. Modele și metode în studiul biomembranelor 164
VII.4. Arhitectura supramoleculară a membranelor celulare 169
VII.4.1. Evoluția modelelor biofizice 169
VII.4.2. Modelul „mozaicului fluid" 171
VII.5. Biofizica transportului transmembranar 174
VII.5.1. Clasificarea biomembranelor în funcție de permeabilitate 174
VII.5.2. Clasificarea proceselor de transport transmembranar 176
VII.5.3. Transportul pasiv 177
VII.5.3.1. Difuzia simplă. Legile lui Fick 177
VII.5.3.2. Difuzia facilitată: canale ionice 180
VII.5.3.2.1. Ionofori 180
VII.5.3.2.2. Metoda „patch-clamp" pentru studiul canalelor ionice 181
VII.5.3.2.3. Proprietățile canalelor ionice 183
VII.5.3.3. Difuzia facilitată: transportorii membranari 186
VII.5.3.4. Osmoza: bazele mecanismelor moleculare 187
VII.5.3.5. Echilibrul Donnan 191
VII.5.4. Transportul activ 191
VII.5.4.1. Pompele ionice 191
VII.5.4.2. Transportul activ secundar 197
VII.5.4.3. Translocarea de grup 198
VII.6. Teoria comunicării intercelulare 199
VII.6.1. Componentele unui sistem de comunicare intercelulară 199
VII.6.2. Principalele modalități de transmitere a informației 202
VII.6.3. Clasificare și caracteristici generale ale receptorilor celulari 202
VII.6.4. Receptori membranari 203
VII.6.4.1. Structura moleculară generală a receptorilor membranari 204
VII.6.4.2. Caracteristici funcționale generale ale receptorilor membranari 205
VII.6.4.3. Clasificarea receptorilor membranari 207
VII.6.4.4. Receptori asociați cu proteina G 208
VII.6.4.5. Receptori cu generare de mesageri secundari 212
VII.6.4.6. Receptori cu activitate protein-kinazică intrinsecă 216
VII.6.4.7. Receptori asociați canalelor ionice 218

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.6.4.8. Receptori de internalizare a liganzilor 219
VII.6.5. Receptori intracelulari 220

VIII. BAZELE BIOFIZICE ALE BIOELECTRICITĂȚII 223

VIII.1. Mecanismele biopotențialelor de repaus 223
VIII.2. Biofizica biopotențialelor de acțiune 225
VIII.3. Fenomenele bioelectrice musculare 230

IX. FLUXUL SANGUIN. CARACTERISTICI BIOFIZICE 233

IX.1. Fluxul sanguin: flux Newtonian, flux nonNewtonian, flux laminar și turbionar .. 233
IX.2. Viscozitatea sanguină 234
IX.3. Presiunea sanguină și influența elasticității peretelui vascular 237

X. ELEMENTE DE BIOFIZICA RESPIRAȚIEI 239

X.1. Ventilație pulmonară și elasticitate 239
X.2. Biofizica surfactantului pulmonar 241

XI. BIOFIZICA SISTEMELOR SENZORIALE 243

XI.1. Semnale fizice și mesaje senzoriale 243
XI.2. Biofizica receptorului auditiv 244
XI.3. Mecanisme biofizice ale receptorului vizual 245
XI.4. Receptorul olfactiv și gustativ 247
XI.5. Psihofizica: legea lui Weber-Fechner 248

BIBLIOGRAFIE 249

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

I. INTRODUCERE

I.1. Rolul fizicii în evoluția medicinei - exemple
I.2. Definiția și evoluția biofizicii
I.3. Biofizica - știință de frontieră
I.4. Clasificarea domeniilor de studiu ale biofizicii
I.5. Biofizica medicală: trei direcții de evoluție

---

*Întrebarea care stăruie în mintea celor mai mulți studenți la medicină este: "De ce trebuie să învățam despre fizică în relație cu celulele și structurile subcelulare, tehnici de studiu ale acestora, radiații ... cu alte cuvinte , de ce trebuie să "învățam" **Biofizică**, de ce să nu învățăm direct despre pacient și despre boală?"*

*De ce este obligatorie **Biofizica** și ocupă un loc important în curricula tuturor facultăților de medicină din lume? Un răspuns elaborat are, în parte, legătură cu observația făcută inițial de către **Rudolph Virchow** în urmă cu 150 de ani (citat de **S. R. Goodman**) care spunea că "schimbările patologice sunt determinate de disfuncții la nivel celular, ceea ce poate explica necesitatea studiului **Biofizicii** celulare". Un lucru trebuie să ne fie clar : biofizica ne învață, în esență, să GÂNDIM, să dezvoltăm capacitatea de a realiza conexiuni logice științifice.*

*Totuși, prin ce se diferențiază **Biofizica celulară** de **Biologia celulară**, de **Biochimie** sau de alte științe fundamentale? Pentru a înțelege răspunsul la această întrebare trebuie să **definim Biofizica**, în cele ce urmează.*

I.1. Rolul fizicii în evoluția medicinei - exemple

Fizica a fost prima știință experimentală, prin folosirea de metode, instrumente, aparate și legi în folosul studierii fenomenelor naturale. Dezvoltarea fizicii a fost importantă pentru medicină prin prisma a trei aspecte:

a) ***Fizica pentru organism***

În antichitate ***acțiunea terapeutică*** a unor agenți fizici a fost utilizată în activitatea medical a perioadei respective.

În zilele noastre dezvoltarea fizicii permite utilizarea de instrumente complexe pentru

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cercetare, diagnostic și tratament. Dezvoltarea ***biologiei și a medicinei*** a fost dependentă de ***evoluția fizicii***, deoarece evoluția acestor științe necesită ***metode și instrumente de studiu*** din ce în ce mai complexe.

b) ***Fizica în organism***

Studiul fenomenelor fizice implicate în fiziologia și fiziopatologia organelor prin folosirea ***conceptelor și a metodelor fizice*** poate fi considerat un aspect fundamental în medicină, în relație directă cu înțelegerea bolilor.

c) ***Fizica împotriva organismului*** este acea latură a fizicii care se ocupă de studiul ***acțiunii dăunătoare*** a unor factori fizici, în primul rând a radiațiilor ionizante.

Evoluția biologiei și a medicinei a depins de evoluția fizicii deoarece:

- fenomenele petrecute în structurile vii nu au putut fi aprofundate înainte de dezvoltarea unor ramuri ale fizicii;
- dezvoltarea unor dispozitive fizice a dus la o înțelegere mai bună a diagnosticului și atratamenului unor boli, iar descoperirile cele mai noi au dus la o aprofundare continuă a acestora. Cel mai bun exemplu este dezvoltarea de tehnici de studiu microscopic – în particular microscopia electronică a schimbat înțelegerea structurii membranei celulare, de exemplu (a se vedea și ***Capitolul VII***).

I.2. Definiția și evoluția biofizicii

Biofizica poate fi definită ca o știință ce are ca scop:

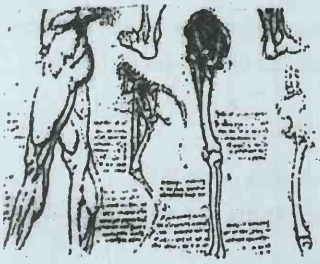
- studiul fenomenelor fizice (și nu numai) din structurile vii, folosind metode, tehnici și legi din fizică;
- studiul efectelor unor factori fizici (de exemplu, radiații ionizante și neionizante, temperatură, ultrasunete, electricitate, câmp magnetic sau gravitațional etc.) asupra organismelor vii.

Biofizica nu este un produs doar al secolului 20, ci este o știință care a existat în paralel cu ***fizica***, dovada acestui fapt fiind utilizarea, în științele vieții, a descoperirilor fizicii încă de acum 400 de ani.

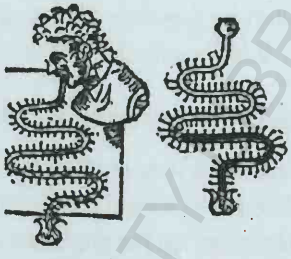
Începutul biofizicii poate fi pus în relație cu ***Galileo Galilei (1564-1642)***, cel mai cunoscut astronom și fizician al ***Renașterii;*** instrumentul de măsură utilizat de acesta în majoritatea măsurătorilor sale a fost pendulul. Un contemporan al său ***Sanctorius de Padua (1561-1636),*** numit și ***Santorio Santorio,*** a introdus în medicină primul instrument de măsură precis – *pulsilogium,* care avea la bază un pendul. ***Sanctorius*** a construit diverse tipuri de instrumente, dar toate aveau la bază același principiu: frecvența de oscilație a pendulului varia în funcție de lungimea sa, până când frecvența de oscilație se suprapunea peste bătaia-puls (pendulul era realizat dintr-un glonț de plumb la capătul unui fir de mătase). ***Sanctorius*** a stabilit pentru prima dată că pulsul nu numai că variază de la o persoană la alta, dar poate varia și la aceeași persoană în funcție de starea și de gradul de agitație al persoanei

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

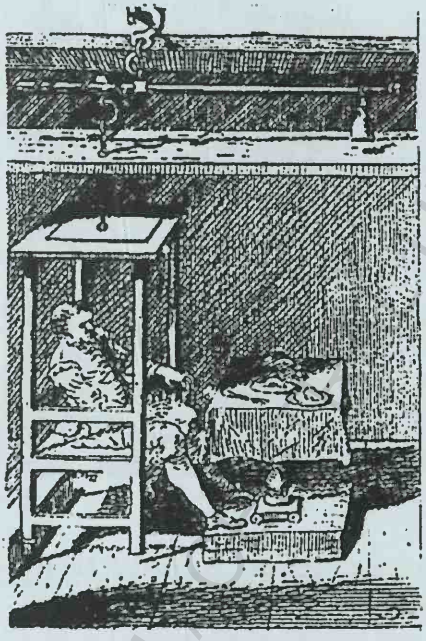
respective. Această observație a făcut-o prin necesitatea modificării lungimii pendulului. Prin urmare, metoda sa nu a fost doar prima care a măsurat pulsul ci și prima care avea *lungimea* ca element de transformare. Tot el este recunoscut pentru primul experiment în medicină (fig. 1.2.1.c, a se vedea și slide-urile de la curs).



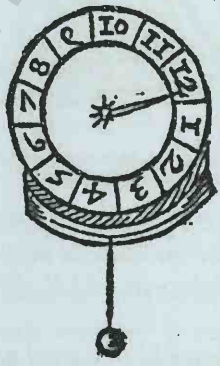
a) Leonardo da Vinci (1452 – 1519) – studii asupra locomoției



b) Termometru bucal, 1625 (folosit în clinică din 1825)



c) Santorio Santorio: determinarea greutății înainte și după masă



d) Instrument de măsură a pulsului (pulsilogium)

Figura I.2.1. Exemple de instrumente de măsură simple și dedicate: a),b),c),d) – (102)

După ***Renaștere,*** fizica a avansat prin intermediul inovațiilor aduse de ***Sir Isaac Newton*** (1642 – 1727). El a pus bazele mecanicii și opticii moderne. Unul dintre discipolii săi cei mai fervenți a fost ***Sir David Brewster*** (1781 – 1868), care, ca urmare a scepticismului manifestat față de teoriile epocii sale despre natura ondulatorie a luminii, a fost descris ca *unul*

dintre cei mai importanți fizicieni ai secolului XVIII. ***Brewster*** a aplicat noi principii matematice pentru a îmbunătăți teoriile vremii sale, cercetările sale în studiul difracției la nivelul celulelor cristalinului reprezentând un exemplu de aplicare a principiilor fizice și matematice în soluționarea unei probleme de biologie. El a vizualizat secțiuni fine de cristalin de cod cu ajutorul unui microscop cu putere măritoare mare (microscopul ***Ross***) și a putut să identifice structuri pe care le-a descris ca fiind invaginații pe suprafața celulară. Acestea au fost redescrise, obiectiv, abia în 1975, cu ajutorul microscopului electronic de baleiaj.

Alte personalități care au pus bazele ***biofizicii*** au fost:

- ***René Descartes:*** a considerat corpul uman ca fiind o mașină complexă;
- ***Galileo, Borelli***: au studiat mecanismul mișcărilor respiratorii;
- ***Harvey, Hales***: au studiat presiunea osmotică.

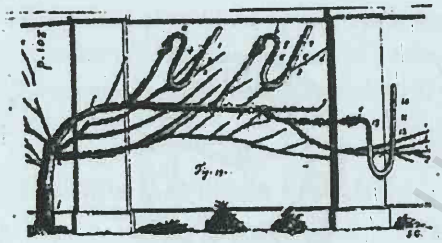


Figura I.2.2. Prima măsurare a presiunii osmotice (pe rădăcini de plante): Stephen Hales – sec. XVII –XVIII (102)

Figura I.2.3. Corpul uman privit ca o mașină complexă

- ***Galvani***: a pus bazele bioelectricității fiind numit, ca urmare, și *părintele bioelectricității*;
- ***Marey***: a realizat un instrument pentru măsurători pneumatice.

De departe, însă, dezvoltarea cea mai rapidă a biofizicii a avut loc în secolele 20 și 21, când un mare număr de ***premii Nobel pentru medicină și fiziologie*** au revenit științelor fundamentale, dintre care face parte și ***biofizica*** *(exemple pe slide-urile de la curs).*

I.3. Biofizica - știință de frontieră

Biofizica este o știință de frontieră care necesită cunoștințe de biologie, fizică, chimie-fizică, chimie, biochimie și chiar matematică și se folosește de principii, metode și instrumente pentru a studia sisteme vii.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

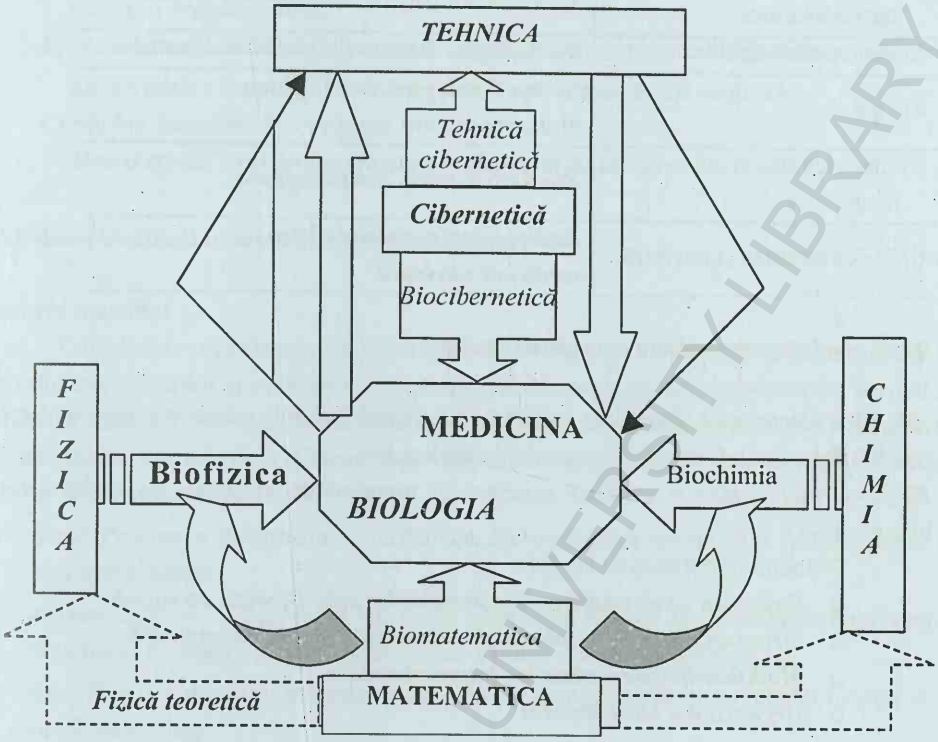


Figura I.3.1. Relația biofizicii cu alte științe

Societatea Americană de Biofizică precizează: "gama de interese la care se referă ***biofizica*** este foarte largă, biofizicienii utilizând metode teoretice și experimentale și dezvoltând metode fizice și chimice noi pentru a studia mecanismele proceselor biologice la orice nivel".

I.4. Clasificarea domeniilor de studiu ale biofizicii

Domeniile de studiu ale ***biofizicii*** se pot clasifica după două criterii:

A. După domeniile mari ale fizicii clasice;
B. După nivelul de organizare al materiei studiat.

A. După domeniile mari ale fizicii clasice:

Domeniul fizicii	*Domeniul biofizicii*
1) Mecanica	***Biomecanica*** (locomoția animală, motilitatea celulară, biomecanica componentelor celulare)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2) Fizica moleculară și termodinamica	*Termodinamica biologică, bioenergetica*
3) Fizica stării lichide	*Bioreologia, hemoreologia, hemodinamica*
4) Optica	*Optica fiziologică, fotobiofizica, bioluminescența*
5) Electricitatea și magnetismul	*Bioelectricitatea, neurobiofizica*
6) Fizica atomică și nucleară	*Radiobiologia, radiobiofizica, medicina nucleară*

B. După nivelul de organizare al materiei studiat:

- ***Biofizica electronică (cuantică)*** - aflată în relație cu biochimia cuantică și care studiază modificările sarcinii electrice intra- și intermoleculare.
- ***Biofizica moleculară*** – studiază structura și proprietățile biofizice ale moleculelor biologice.

  Domenii importante de studiu:
  - ***Structura conformațională a proteinelor prin difracție cu raze X***
  - ***Structuri dinamice – tehnici de rezonanță magnetică nucleară***
  - ***Modificările interacțiunilor intermoleculare***
  - ***Organizarea biosistemelor***

- ***Biofizica celulară*** studiază aspectele biofizice (formă, dimensiuni, interacții electrostatice etc.) ale celulelor individuale (limfocite, neuroni, eritrocite, fibre musculare etc.) și relația cu fiziologia și patologia organismului viu.

  Domenii importante de studiu:
  - ***Bioelectrogeneza***
  - ***Interacțiuni specifice intercelulare***
  - ***Transmiterea stimulilor***
  - ***Proprietăți biofizice celulare***

- ***Biofizica sistemelor complexe*** se ocupă de studiul organismelor vii și a relațiilor pe care acestea le au cu mediul înconjurător.

I. 5. Biofizica medicală: trei direcții de evoluție

Biofizica medicală este în relație cu fiziologia și biochimia și prezinta ***trei mari direcții de evoluție:***

A) înțelegerea structurilor corpului uman și a fenomenelor fizice folosind metode și concepte din fizică.

EDUARD / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De exemplu: rolul ***biofizicii*** în înțelegerea unei boli moleculare – vom lua drept exemplu ***drepanocitoza.***

B) dezvoltarea de tehnici fizice și instrumente pentru cercetare, diagnostic și tratament.

De exemplu: vom detalia evoluția și principiile ***imagisticii medicale.***

C) Studiul factorilor fizici externi.

De exemplu: vom detalia ***efectul accidentului de la Cernobîl.***

A) Rolul biofizicii în înțelegerea drepanocitozei

Istoria maladiei

Date despre o boală manifestată clinic, în *Africa*, prin episoade dureroase repetate la nivelul extremităților și evoluție spre deces rapid au rămas consemnate încă din secolul al XIX-lea. *James Herrick*, un medic englez, a fost primul care a identificat celulele "în seceră" la un student din *Grenada*. Câteva observații referitoare la anemia falciformă datează din prima jumătate a secolului XX:

- *Linus Pauling* a demonstrat o mobilitate electroforetică anormală a hemoglobinei la indivizii afectați;
- *Vernon Ingram* a descoperit că boala este determinate de substituția unui singur aminoacid în molecula hemoglobinei din celulele "în seceră" (HbS);
- *Max Perutz* a descifrat structura moleculară a hemoglobinei și a elucidat funcția ei la nivel molecular;
- *Janet Watson* a observat că boala se manifesta la copii după scăderea nivelului de hemoglobină fetală (HbF) și astfel a postulat efectul benefic al HbF asupra manifestărilor bolii.

Se poate observa cum descoperirile legate de mecanismele de apariție ale acestei boli se corelează cu evoluția metodelor de studiu.

Elemente esențiale privind evoluția cunoștințelor despre boală în paralel cu evoluția metodelor de studiu:

- Inițial ***drepanocitoza*** era cunoscută sub denumirea de ***anemie Mediteraneană***, ca urmare a caracteristicilor bolii cunoscute în acel moment (secolul XIX): boală cu agregare familială observată în regiunea Mediteraneană, manifestată prin anemie și disfuncție renală;
- ***După 1900,*** odată cu dezvoltarea tehnicilor de microscopie **(microscop optic, microscop cu contrast de fază)** a fost observată o formă modificată a eritrocitelor – celule "în seceră"; aceste eritrocite au fost numite *drepanocite* de la termenii *drepanos* (lb. greacă) și *falcus* (lb. latină). Ca urmare, boala este cunoscută sub diverse nume: **siclemie, drepanocitoză, anemie falciformă.**
- ***După 1950*** au fost dezvoltate tehnici noi care au permis studiul și mai aprofundat al bolii:
  - ***Microscopia electronică*** a permis studiul morfologic celular.
  - ***Cromatografia și difracția cu raze X*** au făcut posibil studiul structurii primare și conformaționale a moleculei de hemoglobină.S-a constatat, astfel, că structura normal,

SUMAI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

globulară, a hemoglobinei era înlocuită la pacienții cu anemie falciformă de o structură fibrilară. De asemenea, în structura primară a hemoglobinei din drepanocite, al VI-lea aminoacid al lanțului β, care în mod normal este *acidul glutamic* era înlocuit cu *valina*. Odată cu evoluția geneticii, după 1958 (moment considerat *data de naștere a medicinei moleculare*), au putut fi explicate modificările genetice care apar în această maladie – modificarea unui codon al genei β6 care determină schimbarea unui aminoacid cu altul (s-a explicat astfel caracterul familial al bolii și caracteristicile ei de transmitere). Modificarea acelui unic aminoacid, acidul glutamic, duce la modificări ale interacțiunilor electrostatice, ale legăturilor de hidrogen și, ca urmare, la modificarea conformațională a hemoglobinei nou formate, HbS. Polimerizarea hemoglobinei dezoxigenate este evenimentul inevitabil și esențial în patogeneza moleculară a bolii. Acest fenomen depinde de un număr de factori: concentrația hemoglobinei intraeritrocitare, gradul de desaturare celulară în oxigen, pH-ul și concentrația intracelulară de HbF. Inhibarea polimerizării HbS duce la formarea de molecule asimetrice HbS/HbF.

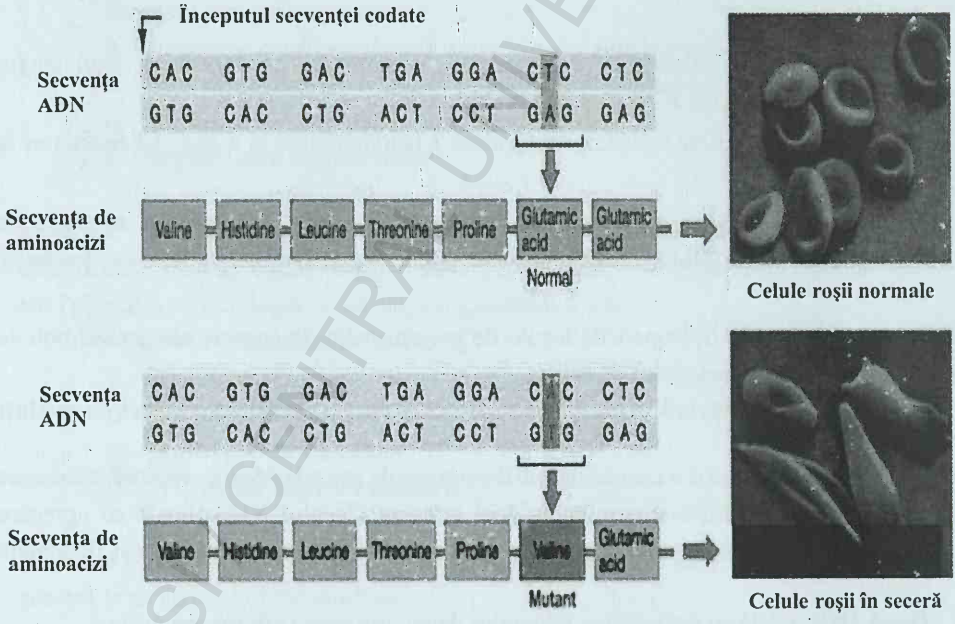

Începutul secvenței codate
Secvența ADN
CAC GTG GAC TGA GGA CTC CTC
GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG
Secvența de aminoacizi
Valine Histidine Leucine Threonine Proline Glutamic acid Glutamic acid
Normal
Celule roșii normale
Secvența ADN
CAC GTG GAC TGA GGA CAC CTC
GTG CAC CTG ACT CCT GTG GAG
Secvența de aminoacizi
Valine Histidine Leucine Threonine Proline Valine Glutamic acid
Mutant
Celule roșii în seceră

Figura I.5.1. Schimbarea structurii primare cauzează precipitarea moleculelor de hemoglobină la concentrații mici de oxigen. Ca urmare, eritrocitele își schimbă forma și elasticitatea și obstruează vasele de calibru mic – (125)

Caracteristicile de polimerizare ale unor amestecuri de HbS și alte câteva variante de Hb arată că reziduurile 22, 80 si mai ales 87 de pe lanțul γ fac parte din situsurile de interacțiune intermoleculară care stabilizează polimerii de HbS dezoxigenată *(figura 1.5.2.B)*. Aceste modificări duc la pierderea proprietăților elastice ale eritrocitelor, obstrucția capilarelor de calibru mic și hemoliză consecutivă.

BCU "SIMION CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY"

Fibrilele de HbS se aliniază formând o structură care duce la deformarea eritrocitului și pierderea elasticității și a deformabilității sale. Cinetica procesului de polimerizare are un rol critic asupra reologiei și morfologiei eritrocitelor circulante. Deoarece timpul de tranzit prin vasele din microcirculație este scurt comparativ cu durata procesului, majoritatea eritrocitelor nu sunt supuse acestui proces de polimerizare. Dacă timpul de tranzit prin mica circulație crește din cauza condițiilor locale, procesul de polimerizare se poate petrece și atunci aproape toate eritrocitele vor conține polimeri de HbS și vor fi mai puțin deformabile.

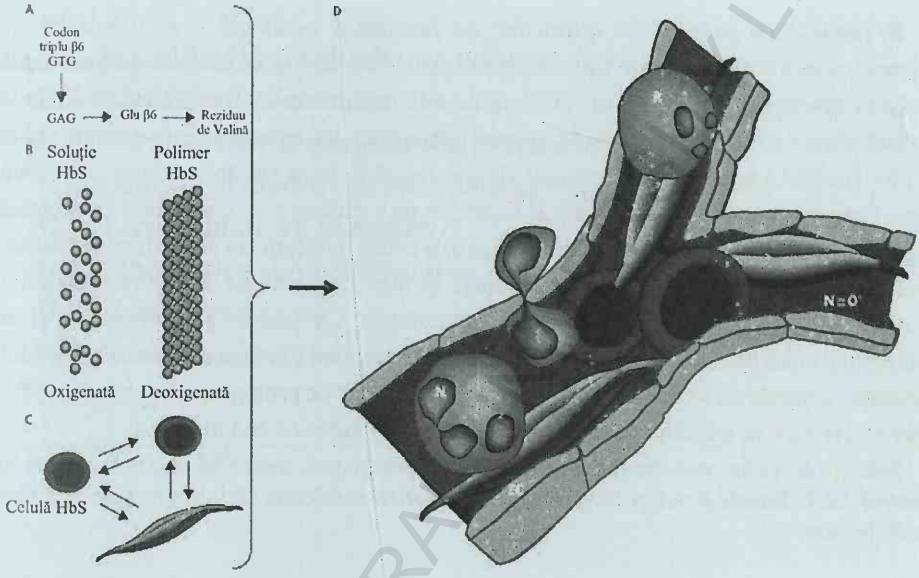


Figura I.5.2. (A) Înlocuirea unui singur aminoacid (GTG cu GAG). (B) Polimerizarea HbS. (C) Schimbarea formei eritrocitelor care conțin polimeri de HbS. (D) Secțiune transversală printr-un capilar. *EC=endoteliu. R=reticulocit. N=leucocit. N::O·=biodisponibilitatea NO. Obstrucția lumenului este inițiată de aderența reticulocitelor la endoteliu, apoi trombul este definitivat prin aglomerarea eritrocitelor modificate. Leucocitele participă la formarea agregatului heterocelular și biodisponibilitatea NO, esențial pentru vasodilatație, scade – (125)*

Mecanismul descris inițial pentru obstrucția vasului capilar, care duce la criza vasculo-ocluzivă, era alterarea deformabilității eritrocitare care, în timpul tranzitului capilar, determină distrugerea hematiilor. Studii mai noi demonstrează că mecanismul propriu-zis este însă unul mult mai complex, eritrocitele modificate morfologic fiind blocate în special în venulele din microcirculație. Evenimentele inițiale, cruciale pentru vasooclu zie, includ aderarea eritrocitelor la endoteliu venular postcapilar (mai ales reticulocite și celulele slab deformate).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

Aderența leucocitelor (modificarea adezivității celulare) cu formarea agregatelor heterocelulare (leucocite si celule deformate ireversibil) contribuie și ele la obstrucție, determinând hipoxie locală cu inducerea polimerizarii HbS și extinderea obstrucției la arborele vascular vecin. Migrarea neutrofilelor prin joncțiunile de tip gap de la nivelul endoteliului stimulează procesul imflamator. În ultima perioadă atenția s-a îndreptat, în plus, către o disfuncție în reglarea tonusului vasomotor prin perturbarea mediatorilor vasodilatației, cum ar fi oxidul nitric (NO), mecanism pe care îl veți înțelege mai detaliat când veți studia *Fiziopatologia*.

B) înțelegerea principiilor tehnicilor de imagistică medicală - este deosebit de importantă pentru obținerea unor diagnostice imagistice de calitate, cu alegerea personalizată a tipului de investigație în funcție de informațiile solicitate de medic. Deși imaginea obținută prin două tehnici de imagistică poate să semene în aparență, informația pe care o conțin poate să difere esențial în relație cu principiul fizic care stă la baza fiecăreia dintre cele două tehnici. Spre exemplu, nuanțele de alb și negru de pe o radiografie, comparate cu aceleași nuanțe de pe o imagine obținută prin rezonanță magnetică nucleară, au semnificație diferită: pe imaginea radiologică (obținută prin expunere la raze X) gradul de înnegrire al filmului este invers proporțional cu gradul de absorbție al radiației X în țesuturi și, prin urmare, și cu densitatea țesutului respectiv. În imaginile obținute prin rezonanță magnetică nucleară gradul de înnegrire depinde de densitatea de atomi cu număr impar de protoni din țesutul respectiv, practic va depinde de numărul de protoni și, deci, de cantitatea de apă din țesut.

Principiile celor mai importante tehnici de imagistică medicală sunt prezentate în ***Capitolul XIII, Bazele fizice și biofizice ale imagisticii medicale.*** Detalii găsiți și pe slide-urile de la curs.

C) **Studiul impactului factorilor fizici din mediul înconjurător asupra organismului** este important atât din punct de vedere al prevenției acțiunii nefaste a acestora la expuneri de lungă sau de scurtă durată, dar și din punct de vedere al potențialelor efecte benefice ale unora dintre factorii fizici în relație cu caracteristicile fizice ale acestora sau/și ale expunerii. Un exemplu este folosirea radioizotopilor cu caracteristici adecvate (timp de înjumătățire scurt, emisie gamma, energie între 100-200 keV) pentru scintigrafia diagnostică, în medicina nucleară convențională, (fără a provoca reacții adverse), în timp ce alți radioizotopi (cu timp de înjumătățire lung, emisie corpusculară α sau β, energie mare) pot provoca leziuni tisulare ireversibile. Acțiunea unor factori fizici asupra organismului este detaliată în ***Capitolul XIV, Efectele unor factori fizici asupra biosistemelor*** și pe slide-urile de la curs ***(Accidentele nucleare de la Cernobîl și Fukushima).***

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. TEORIA SISTEMELOR ÎN BIOLOGIE ŞI MEDICINĂ

II.1. Semnificaţia şi delimitarea noţiunii de sistem
II.2. Clasificarea sistemelor
II.3. Caracteristicile generale ale sistemelor biologice
II.4. Condiţii şi moduri de abordare în studiul sistemelor
II.5. Termodinamica biologică
II.6. Cibernetica şi biocibernetica
II.7. Sisteme complexe
II.8. Complexitate şi haos în biosisteme
II.9. Ce este viaţa?

II.1. Semnificaţia şi delimitarea noţiunii de sistem

Una dintre metodele folosite pentru studiul biologiei şi medicinei este ***metoda sistemelor.*** Această metodă se ocupă tocmai de caracterul organizat al vieţii şi se bazează în primul rând pe ideea că materia, fie ea vie sau nu, este organizată în sisteme ierarhice. Se poate vedea, spre exemplu, cum în biologia moleculară s-au acumulat cantităţi mari de informaţii care nu pot fi folosite independent unele de altele în practica medicală, iar încercările de a unifica aceste date au fost relativ puţine. Încercarea cea mai reuşită de a oferi o bază comună de la care se poate porni în explicarea unor funcţii din materia vie (din care face parte şi corpul uman), fie în cadrul unor condiţii patologice, fie în cazul unor condiţii fiziologice, este ***teoria sistemelor.*** Această teorie, deşi a fost formulată prima dată de către un biolog, nu a rămas limitată doar la biologie şi ştiinţele conexe ei, ci s-a extins la toate domeniile ştiinţei, inclusiv cele tehnice.

Ideea unei ***teorii generale a sistemelor*** a fost pentru prima dată propusă de ***Ludwig von Bertalanffy*** în 1938, în cadrul cursurilor susţinute la Universitatea din Viena şi s-a regăsit apoi, în 1951, în lucrările publicate de el. Teoria consideră că *"biologia modernă trebuie să considere organismul viu ca pe un obiect sistemic"*,

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

noțiunea de sistem fiind definită ca un "*complex de elemente care sunt în interacțiune unele cu altele*". Scopul acestei teorii este să realizeze o descriere generală a sistemelor indiferent care este structura lor sau natura elementelor din care sistemul este alcătuit.

Alte definiții ale noțiunii de sistem ar putea fi:

- ***Amosov, 1965***: "*Un sistem reprezintă o sumă de elemente care pot fi identice sau diferite și care se află în conexiune unele cu altele, conexiunea fiind guvernată de anumite legi.*"
- ***O definiție didactică***: un sistem este o colecție de componente aranjate și interconectate într-un mod definit. Componentele pot fi: biologice, fizice, chimice sau rezultatul combinației acestora trei.

Esențial este că sistemul luat în ansamblu poate avea proprietăți diferite față de cele ale elementelor individuale care îl compun. Spre exemplu, o moleculă este un sistem alcătuit din atomi care interacționează în așa fel încât să creeze un tot, un sistem unitar, cu o anumită integralitate și anumite proprietăți. Un alt exemplu: molecula de apă, alcătuită din doi atomi de hidrogen și unul de oxigen, are caracteristici diferite de cele ale atomilor din componență și în plus proprietățile atomilor odată apaținând acestei molecule se schimbă datorită interacțiunii cu ceilalți atomi care alcătuiesc molecula (așa apare spre exemplu caracterul parțial ionic al legăturii hidrogen-oxigen și, în fine, caracterul de dipol al moleculei de apă, care are consecințe asupra unor sisteme biologice mai complexe, în care apa este doar un element component al sistemului).

II.2. Clasificarea sistemelor

O clasificare a sistemelor se poate vedea în tabelul de mai jos:

Tabel II.2.1. Clasificarea sistemelor din punctul de vedere al schimbului de materie și energie

Tipul sistemului	*Schimb de materie*	*Schimb de energie*	*Exemplu*
Izolat	Nu	Nu	- Entitate pur teoretică
Închis	Nu	Da	- O grupă de studenți la un curs de Biofizică
Deschis	Da	Da	- O grupă de studenți în pauza unui curs de Biofizică - Toate organismele vii

O *clasificare* mai practică a sistemelor le poate împărți în funcție de:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *Natura elemetelor componente și legile care le guvernează interacțiunea*, ținând cont și de aspectele studiate: sisteme biologice, fiziologice, fizice și biofizice.
- *Relația cu sistemele din jur*: sisteme izolate, închise, deschise.
- *Modul de funcționare:* împarte sistemele deschise în sisteme deschise cu autoreglare sau nu, cele cu autoreglare la rândul lor incluzând atât sistemele cibernetice cât și pe cele biologice.

Sisteme biologice, fiziologice, fizice și biofizice

Organismul uman, ca și toate celelalte sisteme biologice vii, se menține într-un echilibru dinamic: face schimb de substanță și energie cu mediul înconjurător, dar își menține integralitatea și funcționalitatea printr-o serie de procese anabolice și catabolice, toate aceste procese fiind în mod normal autoreglate.

Toate sistemele vii sunt ***sisteme deschise, cu autoreglare.***

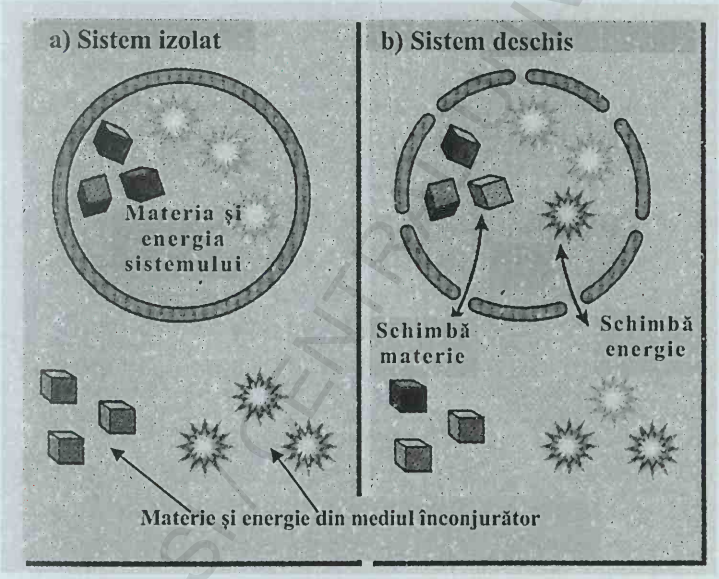


Figura II.2.1 Sisteme izolate și sisteme deschise:

a) între un sistem izolat și mediul său înconjurător nu există schimb de materie și energie;

b) sistemul deschis schimbă atât materie cât și energie cu mediul înconjurător (59)

Elementele care intră în componența sistemelor biologice sunt atomi, molecule, conglomerate moleculare, celule, țesuturi, organisme, populații, etc. Noțiunea de sistem biologic o înglobează și pe aceea de sistem fiziologic caracterizat printr-o serie de funcții specifice. Dacă este realizată descrierea unui sistem prin prisma funcțiilor sale, atunci acest sistem poate fi considerat ca fiind unul fiziologic (spre exemplu dacă studiem sistemul muscular prin prisma contractilității sale atunci acest sistem muscular

UMF IAȘI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

poate fi descris ca fiind un ***sistem fiziologic***). Aceluiași sistem muscular îi putem studia proprietățile elastice și atunci îl putem considera ca fiind un ***sistem biofizic***. Dacă vom cantifica mărimile fizice măsurabile ale unui sistem atunci îl vom putea descrie prin prisma termenului de ***sistem fizic***.

Studiul biofizic al sistemelor le include pe acestea în grupul sistemelor biofizice și, extrapolând, le va include și în grupul mare al sistemelor biologice care pot fi studiate folosind mărimi cantificabile prin metode fizice sau care au la bază fenomene specifice acelui sistem și care pot fi descrise prin legile fizicii.

II. 3. Caracteristicile generale ale sistemelor biologice

Sistemele biologice au un număr de caracteristici specifice lor:

1. ***Caracterul informațional***: se referă la abiltitatea de a primi, acumula și converti informația provenită din mediul înconjurător (informația primară). Transformarea informației primare în alte tipuri de semnale care pot fi procesate de către sistemele vii se numește decodare, rezultatul acestei operațiuni fiind informația secundară (de exemplu, potențialul de acțiune).
2. ***Integralitatea***: biosistemul este o unitatea care are caracteristici structurale și funcționale noi, care nu aparțin și elementelor componente ale sistemului luate în parte; un sistem biologic nu poate fi caracterizat doar prin suma părților sale componente. Caracteristicile și funcțiile fiecărei componente a sistemului depind de reglarea întregului sistem.
3. ***Programul***: acesta se datorează schimbului permanent de energie și substanță cu mediul înconjurător care determină mici modificări ale sistemului fără să afecteze sistemul în ansamblu pe perioade lungi de timp. Există trei tipuri de programe:

– *programul propriu* (conservarea sistemului) asigură autoreglarea sistemului,
– *programe inferioare*, ale sistemelor subordonate (de ex.: programul molecular sau cel al organitelor în cadrul celulei).
– *programe superioare* care asigură perpetuarea speciei.

Programele inferioare sunt subordonate legilor programelor imediat superioare, de care sunt coordonate; prin caracterul lor specific pot influența programul de rang superior.

4. ***Echilibrul dinamic*** (starea staționară sau steady state): în ciuda schimbului continuu de materie și energie cu mediul înconjurător, a înnoirii continue a sistemului, acesta rămâne neschimbat datorită autoreglării (v. în continuare).
5. ***Autoreglarea***: biosistemele au capacitatea de a compara răspunsul la o anumită comandă cu comanda dată; aceasta se realizează printr-o buclă de feedback. Componentele de comunicare din cadrul buclei de feedback nu sunt specifice fiecărui paramentru, fiind reprezentate, diferit, de sânge pentru sistemul endocrin și de nervi pentru sistemul nervos.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.4. Condiții și moduri de abordare în studiul sistemelor

În marea parte a cazurilor sunt studiate doar anumite proprietăți ale sistemului. Spre exemplu studiem proprietățile fizice ale mușchiului sau, un alt exemplu ochiul ca pe un grup de lentile (acestea sunt astfel exemple de sisteme biofizice).

Orice modificare care se petrece într-un sistem biologic este consecința unui *stimul* care va determina o modificare în starea inițială a sistemului determinand o *reacție* din partea acestuia (un răspuns la stimul). Între răspunsul obținut și stimulul care l-a provocat trebuie să existe o relație, în funcție de natura sistemului. Aceste relații reprezintă ***legile fizice*** care guvernează sistemul **(pentru completarea și actualizarea notiunilor v. si slide-urile de la cursul referitor la *Biosisteme*).**

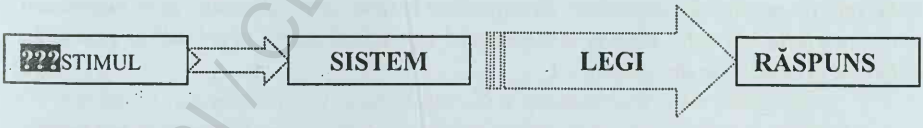
Există ***două condiții esențiale*** pentru studiul unui sistem:

1) Sistemul trebuie individualizat – trebuie separate elementele care nu sunt absolut necesare pentru studiul unui fenomen.
2) Sistemul trebuie delimitat, adică individualizat stimulul.

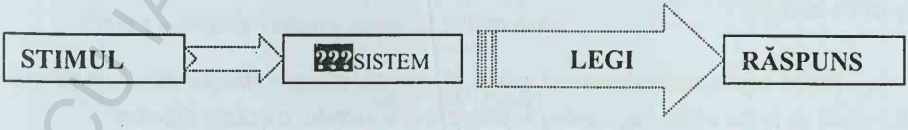
În studiul unui sistem biologic în relație cu mediul său înconjurător nu putem cunoaște toate elementele lanțului de mai sus; în funcție de elementul necunoscut există patru moduri de a studia un sistem biologic:

A. ***Direct:*** se cunoaște stimulul și se cunosc legile sistemului și sistemul, dar nu se cunoaște reacția sistemului la stimul.

B. ***Indirect:*** se cunosc sistemul, legile sistemului și răspunsul la stimul, dar nu se cunoaște stimulul.



C. ***Deductiv:*** se cunoaște stimulul, se cunosc legile sistemului și răspunsul la stimul și se determină sistemul; acesta este principiul "cutiei negre" folosit în cibernetică.



D. ***Inductiv***: se cunoaște stimulul, sistemul și răspunsul sistemului la stimul și se determină legile sistemului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II.5. Termodinamica biologică

✓ *Concepte de bază în aplicarea termodinamicii la sistemele biologice*

Organismele vii sunt sisteme deschise. Ele folosesc materie şi energie din exterior pentru procesele lor interne, metabolice în principal, acest fapt având consecinţe asupra întregului organism care se menţine astfel într-o stare de echilibru. Aceste stări de echilibru dntre celula vie şi mediul ei înconjurător sunt realizate într-un interval de timp destul de scurt.

Toate procesele necesare vieţii sunt însoţite de transport de substanţă asociat cu transformarea sau schimbul energiei şi cu fluxul de sarcină care determină echilibrul local.

Conceptele şi legile termodinamicii ajută la cantificarea reacţiilor, a fenomenelor de transport şi a echilibrului din organismele vii, astfel încât aduc o mai bună înţelegere a proceselor vieţii. Pentru a putea aplica aceste legi organismul este privit ca un sistem termodinamic: un sistem alcătuit dintr-un număr mare de particule aflate în interacţiune continuă.

Cantificarea stărilor unui sistem termodinamic se poate face prin intermediul unor paramentri termodinamici sau variabile de stare. Printre cei mai cunoscuţi astfel de parametri sunt: temperatura, volumul, masa, presiunea şi concentraţia, dar şi energia internă, entalpia, entropia, potenţialul chimic. Relaţiile dintre aceşti parametri sunt date de ecuaţiile de stare deduse din principiile termodinamicii. Aceste ecuaţii se pot aplica chiar şi biosistemelor speciale.

✓ *Primul principiu al termodinamicii*

Legea conservării energiei din termodinamică spune că:

- *în cazul sistemelor izolate energia internă a sistemului este constantă* **($\Delta U = 0$).**

- în cazul *sistemelor deschise*: *dacă energia introdusă din mediul înconjurător sau eliberată în mediul înconjurător de către un sistem termodinamic este cunoscută, atunci variaţia energiei interne a sistemului reprezintă suma algebrică a energiilor eliberate şi absorbite din sistem.*

Deoarece energia termică are un rol special în structurile vii, vom clasifica energia schimbată de către organism cu mediul înconjurator în energie termică şi alte tipuri de energie.

Prima lege a termodinamicii spune că variaţia energiei interne drintr-un proces este egală cu suma algebrică a căldurii disipate şi a lucrului mecanic efectuat:

$$\Delta U = Q + W$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unde:
U reprezintă suma energiilor particulelor care alcătuiesc sistemul (ΔU = variația acestei energii),
Q reprezintă variația lui U prin agitație termică (schimb de căldură),
*W reprezintă variația lui U prin mișcări impuse unui mare număr de particule (lucru mecanic). De ex.: gradient osmotic (**Wosmotic**), gradient chimic (**W chimic**), gradient electric (**W electric**)*

Q are valoare pozitivă dacă sistemul absoarbe căldură și valoare negativă dacă sistemul degajă căldură. *W* are valoare pozitivă dacă asupra sistemului se exercită lucru mecanic și negativă dacă sistemul efectuează lucru mecanic.

Importanța energiei interne *U* a sistemului se desprinde din definiția ei: ea se referă la toate tipurile de energie ale particulelor din sistem. *U* include energia cinetică datorată mișcării continue, aleatorii, specifice atomilor și moleculelor și tot în *U* este inclusă și energia potențială (de legătură) a atomilor și moleculelor care interacționează. De asemenea *U* cuprinde și energiile cinetice și potențiale de origine pur mecanică (energia potențială datorată greutății sistemului și energia cinetică datorată mișcării sistemului). În cazul unui sistem în repaus, aceste energii pur mecanice pot fi neglijate.

Conceptul de energie internă și primul principiu al termodinamicii sunt importante în cazul proceselor în care energia cinetică medie sau energia potențială (datorată rearanjării particulelor) se modifică, îndeosebi în cazul proceselor însoțite de modificări de temperatură, tranziții de fază, reacții biochimice care se caracterizează prin emitere de căldură (căldură specifică, de tranziție și căldură de reacție).

✓ ***Aplicații ale primului principiu al termodinamicii***

- ***Entalpia***

Procesele biologice din organismele vii sunt procese izobare. Aceste procese pot fi descrise simplu prin introducerea unei noi noțiuni, *entalpia (H):*

$$H = U + pV$$

Unde:
p = presiunea sistemului aflat la echilibru, la o temperatură și un volum date,
V =volumul sistemului,
U = energia internă a sistemului

Pentru a descrie variația entalpiei putem scrie:

$$\Delta H = \Delta U + p\Delta V$$

Variația entalpiei este dată de suma variației energiei interne și de lucrul mecanic volumetric (dilatare termică a sistemului). Această ecuație explică importanța

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

entalpiei care permite descriere variației energiei interne și a lucrului mecanic printr-o singură mărime.

- ***Căldura de reacție și entalpia***

Înțelegerea reacțiilor chimice necesită întelegerea schimbului de căldură care se produce. Deoarece în mod normal cantitățile de substanță sunt exprimate în moli, atunci și căldura absorbită sau eliberată trebuie exprimată per mol de substanță, fiind numita *căldură de reacție.*

În cazul proceselor izotermice - izostere această căldură de reacție măsurată la volum constant va fi egală cu energia internă (exprimată tot per mol de substanță):

$$\Delta U = Qv$$

În cazul proceselor izotermice – izobare, căldura de reacție la presiune constantă va fi:

$$\Delta H = Qp$$

✓ ***Exemplu: contracția musculară.***

În cazul contracției musculare, mușchiul generează o cantitate importantă de căldură pe care o vom nota *Q* și care va fi în relație cu tipul de proces: ***Q de repaus, Q de relaxare, Q de contracție, Q de regenerare*** (care se datorează reacțiilor de producere a ATP-ului).

Variația energiei interne *ΔU* este rezultatul unor reacții biochimice (ex: hidroliza ATP, reacția catalizată de creatinkinază, etc.).

Ca toate celelalte sisteme termodinamice vii, mușchiul se supune primului principiu al termodinamicii așa încât variația energiei sale interne este suma dintre căldura generată și lucrul mecanic efectuat într-un anumit interval de timp.

Datele experimentale nu se suprapun întru totul peste aceste date teoretice: contracția musculară pare să producă mai multă *Q* și lucru mecanic decât variația energiei libere (entalpia) care ar corespunde reacțiilor chimice și proceselor fizice necesare contracției. Acest lucru sugerează faptul că mai sunt si alte procese musculare implicate în procesul de contracție care încă nu sunt cunoscute.

✓ ***Principiul al doilea al termodinamicii***

Acesta este principiul creșterii ***entropiei (S)***. Entropia este o măsură a gradului de dezordine dintr-un sistem termodinamic. Un cristal perfect are entropie 0. Cu cât crește gradul de dezordine cu atât crește si entropia.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Teoretic toate sistemele au o evoluție naturală către creșterea gradului de entropie. Organismele vii, mai ales în prima parte a vieții, evoluează către creșterea gradului de ordine, deci entropia lor scade. Acest fapt ne duce la concluzia că organismele vii dețin structuri și mecanisme antientropice.

Sistemele biologice sunt sisteme deschise care schimbă energie și substanță cu mediul exterior: ele iau molecule complexe cu energie joasă și elimină molecule simple rezultate prin metabolizarea celor complexe. Deci organismele vii primesc din mediu entropie negativă și elimină entropie pozitivă.

A *doua lege a termodinamicii* este una cu *semnificație statistică* și exprimă faptul că procesele termodinamice progresează spontan către starea cea mai probabilă: de exemplu căldura este transferată spontan de la un corp cald la unul rece.

Exprimarea cantitativă a celei de a doua legi a termodinamicii introduce astfel o noțiune nouă: *entropia.*

✓ ***Procese termodinamic reversibile și procese termodinamic ireversibile***

Orice proces poate fi descris ca fiind termodinamic *reversibil* dacă sistemul termodinamic care ia parte la proces revine în starea sa inițială, în așa fel încât nicio schimbare nu intervine în final nici asupra sistemului, nici asupra mediul înconjurător. La polul opus acestei situații se află procesele *ireversibile.*

Conform celei de a doua legi a termodinamicii nu există în natură proces termodinamic complet reversibil. În cazul sistemelor biologice putem găsi multe exemple de sisteme care revin la starea lor inițială, dar acest lucru se petrece doar cu schimbări din partea mediului înconjurător asupra sistemului, ceea ce face procesul practic ireversibil. Acest caracter ireversibil se datorează în special schimbului de căldură cu mediul.

Totuși, pentru simplificare, procesele fizice sunt tratate teoretic ca fiind reversibile.

Procesele asociate cu schimb de căldură pot fi considerate reversibile doar dacă se petrec infinitezimal de încet în mai multe etape, trecând prin stări intermediare de echilibru – procese cvasi-statice.

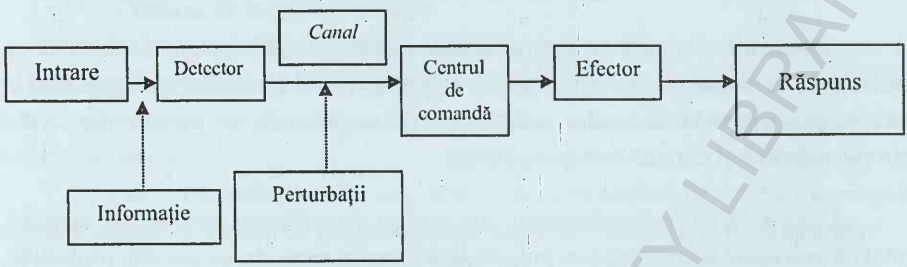
II.6. Cibernetica și biocibernetica

Cibernetica poate fi definită ca *știința care se ocupă cu recepționarea informației, conservarea, transformarea și utilizarea ei în diverse aparate sau în organisme vii.* Cibernetica are *2 mari domenii:* a) *teoria informației* și b) *teoria*

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sistemelor cu autoregare. Se poate discuta de asemenea despre cibernetică tehnică, economică, medicală, etc.

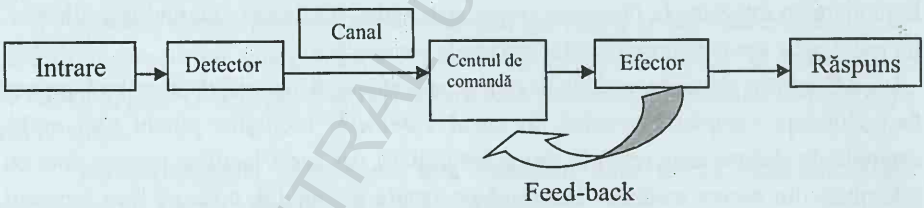
Transmiterea informației poate fi urmărită în diagrama de mai jos:



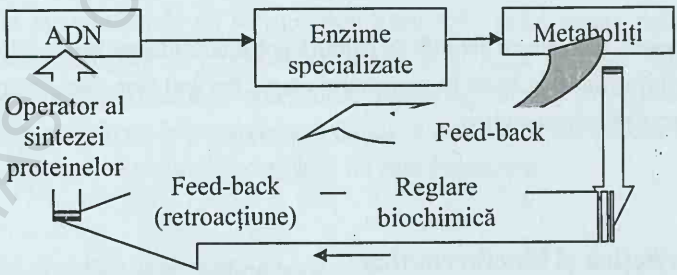
Transmiterea unei informații are loc, într-un sistem deschis, sub influența perturbațiilor din exterior și răspunsul este influențat de ele.

Bucle și sisteme de feed-back

În acest caz centrul de comandă este informat despre rezultatul comenzii printr-o reacție de feed-back. Această buclă permite centrului să corecteze răspunsul atunci când apar perturbații. Mai jos se poate vedea ***diagrama generală a transmiterii informației controlată printr-o buclă de feed-back***:



În organismele vii, majoritatea proceselor se petrec în cadrul unor sisteme cu bucle de feed-back. Spre exemplu se poate vedea mai jos ***diagrama procesului de autoreglare celulară***:

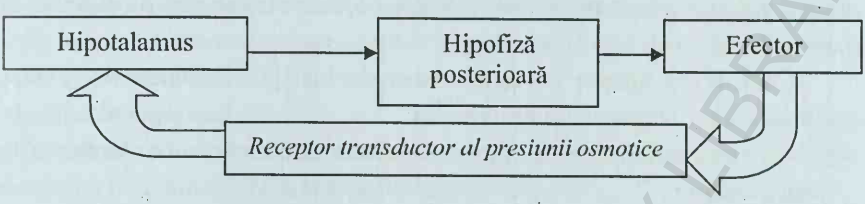


ADN-ul (acidul deoxiribonucleic) comandă sinteza de proteine prin intermediul enzimelor specializate. Dacă structura metaboliților rezultați nu este normală, enzimele specializate pot să interfere cu aceștia printr-o buclă de feed-back determinând, astfel, prima blocare directă a sintezei; între timp, dacă această ajustare nu este suficientă,

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ADN-ul însuşi poate să intervină prin reglarea biochimică pentru a resintetiza molecule normale.

Mai jos se poate vedea un alt exemplu de feed-back în organism:



Sistem de feedback al presiunii osmotice

II.7. Sisteme complexe

✓ ***Lecţii simple învăţate din fenomene complexe***

Întrebarea la care este cel mai dificil de răspuns din biologie este: *De ce dacă legile fizicii sunt atât de simple lumea, şi mai ales sistemele biologice, sunt atât de complexe?*

Complexitatea la care ne referim în acest caz se datorează în primul rând structurii sistemelor biologice care are o varietate extrem de mare. Astfel un organism viu este complex deoarece are multe părţi componente, fiecare dintre ele fiind apărute prin variaţii minime ale aceluiaşi cod genetic.

✓ ***Înţelegerea complexităţii***

Există trei modalităţi de a investiga sistemele complexe pentru a putea obţine cunoştinţe despre comportamentul fizic al mediului înconjurător: experimental, computaţional şi teoretic.

Tehnicile experimentale (în mâinile unui cercetător care ştie să le folosească) pot aduce o gamă variată de date extrem de eficiente.

Metoda computaţională – realizarea de simulări computerizate este de multe ori folosită pentru a verifica, nu doar pentru a completa datele despre mediul înconjurător. De exemplu, pentru a simula dinamica proteinelor nu trebuie descrisă mişcarea fiecărei proteine în parte. Modelarea sistemelor complexe prin teorii complexe ar putea explica structura acestora la scala mica, fără insă să poată oferi informatii despre fenomenele de la nivel macromolecular. Pentru astfel de imagini de ansamblu se folosesc metodele fenomenologice.

Pe scurt, se poate afirma că orice model bun porneşte de la o întrebare, iar gradul de detaliu ales de cel care realizează modelul poate fi un factor determinant care să ducă la un succes sau la un eşec.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ *Complexitatea în sistemele de semnalizare intracelulare*

Semnalizarea în cadrul sistemelor biologice poate acoperi un larg spectru de interacțiuni care merg de la interacțiuni intermoleculare la interacțiuni între specii.

În accepțiunea sa generală, termenul de *complex* face referire la un sistem sau o componentă care prin alcătuirea, sau prin funcția, sau prin ambele, este dificil de înțeles și de verificat.

Căile de semnalizare din cadrul sistemelor biologice alcătuiesc rețele complexe de comunicare. Complexitatea decurge din:

- numărul mare de componente, dintre care multe au izoforme cu funcții superpozabile;
- conexiunile dintre componente;
- relația spațială dintre componente;
- un număr de atribute simultane: ansambluri dinamice, translocație, degradare, canalizare sau reacții chimice;

O metodă simplă de a înțelege complexitatea rețelelor de comunicare este de a începe cu un model simplu la care se adaugă progresiv noi nivele de complexitate.

✓ *Un "cablu de semnalizare"*

Cea mai simplă descriere a noțiunii de semnalizare (comunicare) într-o celulă cu compoziție omogenă, din punct de vedere al chimiei, este aceea de grupare de elemente care au acces în aceeași măsură unele la altele. Proprietățile unui astfel de sistem simplificat depind în întregime de concentrațiile elementelor componente și de vitezele de reacție. Fiecare cale de semnalizare poate fi astfel privită ca un cablu direct care transportă informația între elementele sistemului și, cum între celule nu există astfel de cabluri care să transporte fiecare tip de informație, trebuie să existe molecule cu specificitate pentru fiecare semnal. Se poate deci observa că și în cele mai simplificate modele apare un prim grad de complexitate datorat paletei largi de molecule de semnalizare și a izoformelor lor care pot avea specificitate pentru informația transmisă, dar și cinetici de reacție diferite. Acesta este motivul pentru care vitezele de reacție și concentrațiile reactanților sunt cele care condiționează o descriere cantitativă a sistemului.

✓ *Interacțiunile dintre căile de semnalizare*

În celulă, diferitele căi de semnalizare pot interacționa unele cu altele. Într-un sistem alcătuit din n elemente, în care există două căi de comunicare aflate în posibilă interacțiune unele cu altele, cercetătorul trebuie să adune informații despre n^2 interacțiuni.

Ținând cont de faptul că acesta este doar un mic exemplu despre gradul de complexitate al unui sistem trebuie să analizăm fenomenele și prin prisma conceptelor de compartimentare și organizare regională.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ ***Compartimente***

Existența compartimentelor în cadrul sistemelor celulare introduce câteva noi nivele de complexitate. Spre exemplu, multe dintre moleculele de semnalizare sunt ancorate în membrana citoplasmatică (ex. receptorii), iar membrana celulară este diferită de citosol (deci poate necesita și metode diferite de studiu) și posibil și de organitele celulare. Compartimentarea separă în spațiu "cablurile" amintite mai sus.

✓ ***Organizarea regională***

Cercetările au demonstrat existența organizării regionale prin asamblarea componentelor de semnalizare în siteme funcționale complexe.

Un exemplu este citoscheletul: o structură dinamică pe care celula construiește organizarea regională, cele mai evidente exemple fiind cel al diviziunii celulare, al diseminării inițiale a cancerului sau al transmiterii semnalului prin sinapse. În acest ultim exemplu, citoscheletul pre - și post-sinaptic sunt ancore ale unui mare număr de molecule sinaptice. Modificarea patologică a citoscheletului sinaptic cauzează modificări cu efecte de lungă durată asupra eficacității transmiterii sinaptice.

✓ ***„Schele" și canalizarea reacției***

Termenul de *proteină „schelă" (engl. scaffold protein)* se referă la o nouă clasă de proteine de semnalizare care nu au capacitate de transfer al informației ele în sine dar interacționează cu multe alte proteine de semnalizare pentru a crea o cale de comunicare. De exemplu, *„schelele"* din cascada MAP kinazelor și un număr de alte astfel de proteine au fost identificate. Această organizare se poate solda (așa cum s-a demonstrat *in vitro*) într-o direcționare a reacției, care poate duce la o creștere a eficienței transmiterii semnalului și la o specificitate crescută a fluxului semnalului în ciuda posibilei reactivități încrucișate cu alte căi de semnalizare.

✓ ***Comunicarea între compartimente***

În celulă semnalele din diverse compartimente nu pot funcționa izolate unele de altele și deci comunică prin translocarea moleculelor semnal.

Compartimentarea prin schimbul de molecule dintre compartimente ridică și mai mult nivelul de complexitate și implicit numărul de parametri urmăriți cu cel puțin un alt ordin de putere.

Ultimul nivel de complexitate provine din rolul dual pe care unele compartimente celulare îl joacă – element component al celulei, dar și parte a căilor de comunicare. Așa este, spre exemplu, citoscheletul – un sistem care se poate auto-modifica. Un alt exemplu și mai important este reglarea expresiei genice.

✓ ***Complexitatea sistemului reprezentat de nucleu***

Sistemul central de semnalizare al celulei este reprezentat de nucleu cu întreaga sa mașinărie genetică, a cărui complexitate se bazează pe o serie de componente: enzime, compartimente atent controlate prin sisteme de comunicare și un program

ECOLE CENTRALE UNIVERSITY LIBRARY

genetic scris în ADN care este de ordinul de mărime a gigabiților – incluzând de asemenea și interacțiunile proteină-proteină și proteină-ADN, mecanismul de transcripție și recombinare, precum și procesarea fragmentelor transcrise și exportul ARN-ului prin semnale intrinseci sau primite din exterior.

✓ ***Beneficiile înțelegerii rețelelor complexe de comunicare***

Bazele fiopatologice ale multora dintre afecțiunile umane – cancerul, diabetul, disfuncțiile neurologice – sunt strâns legate de căile de semnalizare fie printr-o disfuncție a unui singur element al căii de comunicare, fie prin disfuncția combinată a a mai multor elemente. Modelarea acestor căi de comunicare poate duce atât la înțelegerea modului în care fiecare element este integrat în sistemul de ansamblu, dar și a modului în care interacțiunile moleculare duc la transmiterea informației.

✓ ***Complexitatea și sistemul nervos***

Creierul este de multe ori descris ca fiind cel mai complex sistem din univers, dar complexitatea sa este greu de cantificat. Ea se poate reflecta în asocierea dintre caracteristicile sale structurale, funcția sa și istoria evoluției sale precum și în sistemele de codare pe care le folosește pentru a reprezenta informația. Caracteristicile structurale nu sunt suficiente pentru a defini complexitatea: raportul dintre masa creierului și masa corpului la rechini este foarte apropiat de cel întâlnit la mamifere, dar abilitățile lor intelectuale nu sunt similare. Același lucru se observă și prin comparații între dimensiunea neocortexului, suprafața sa și numărul neuronilor. Orice descriere a complexității creierului trebuie, în primul rând, să ia în calcul natura adaptativă, nonlineară și nonstaționară a neuronilor înșiși și, apoi, conexiunile lor neomogene și paralele.

II.8. Complexitate și haos în biosisteme

✓ ***Haos și antihaos în sistemele vii***

Haosul poate fi înțeles ca fiind dependența fină a rezultatului de condițiile inițiale.

Sistemele complexe din natură, cum ar fi însăși planeta, sunt alcătuite în egală măsură din elemente ordonate dar și din haos, care se supun unui adevăr simplu: *natura poate produce structuri complexe în situații simple și poate respecta reguli simple în situații complexe*. Această dogmă este valabilă și în cazul altor biosisteme –organismele vii în situații fiziologice și patologice.

Modelul variației datelor culese din biosisteme în situații patologice poate fi atât de complex încât pare aleatoriu. Această aparență de aleatoriu poartă numele de "*haos*". Deoarece comportamentul este non-stohastic (nu se supune unor forțe externe aleatorii) ci deterministic, acest comportament este denumit "*haos deterministic*".

Un exemplu de situație patologică care reprezintă un biosistem complex este o tumoră în creștere care este supusă haosului deterministic.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ ***Proprietățile haosului deterministic și aplicații în studiul patologiei***

Ecuația folosită pe modelele populaționale în astfel de cazuri este:

$$P_{t+1} = gP_t(1-P_t)$$

Unde : P_t = populația tumorală inițială, P_{t+1} = populația la un anumit interval de timp (t), g = constantă care reflectă rata de creștere tumorală

S-au realizat mai multe modele de haos deterministic pentru diverse situații patologice. Sisteme haotice au fost descoperite atât în fiziologia cât și în fiziopatologia sistemului nervos. A fost postulat faptul că acest comportament haotic este esențial pentru aparatul senzitiv fără de care noi tipare de activitate sau învățare nu pot să apară.

Haosul deterministic a fost demonstrat în electrodinamica membranei celulare a neuronilor. Aritmiile ventriculare au fost descrise folosind dinamica haosului și modele matematice destul de simple pot reproduce comportamentul experimental al fibrelor Purkinje și proprietățile de pacemaker ale noduluilui sino-atrial. Date electrocardiografice au fost analizate și s-a demonstrat că unii parametri cum ar fi variațiile intervalului dintre bătăi demonstrează o scădere a complexității odată cu îmbătrânirea și această scădere a complexității este cea responsabilă de incapacitatea de răspuns la stresul fiziologic.

II.9. Ce este viața?

'Viața nu este altceva decât o mișcare a electronilor!' – a spus ***Albert Szent-Gyorgyi***, descoperitorul acidului ascorbic (vitamina C), în 1960. Totuși în mod tradițional există două perspective asupra vieții: *vitalismul* și *mecanicismul.*

1. Conform *vitalismului,* structurile vii se disting prin: entități speciale imateriale cum ar fi sufletul, sau unele proprietăți cum ar fi propunerea de țeluri și urmarea lor, care sunt reunite sub numele de *elan vital.* Vitalismul este incompatibil cu materialismul metafizic.

2. *Mecanicismul* are 2 direcții în explicarea vieții: fizico-chimismul și mașinismul.

- *Fizico-chimismul*: organismele sunt sisteme fizice sau chimice extrem de complexe, fără legi sau proprietăți doar ale lor.
- *Mașinismul*: organismele nu sunt doar sisteme fizice sau fizico-chimice extrem de complexe, ci sunt asemănătoare unor mașini.

BUMAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Un punct de vedere sistemic asupra vieții apare prin prisma *organicismului* (de la ***von Bertalanffy***, 1952, până la ***Mayr***, 1996). Astăzi acest sistem de organizare al conceptelor este mai mult cunoscut ca și *biosistemism* și recunoaște *bios*-ul ca un nou nivel de organizare cu bazele la nivel chimic.

Biosistemismul acceptă faptul că:

a) Organismele vii, ca și sistemele vii (biosisteme) sunt compuse din subsisteme fizico-chimice dar au proprietăți emergente, în mod particular legi, pe care componentele separate nu le au;

b) Unitățile sistemelor biologice sunt organismul în mediul său și multe subsisteme (molecule, celule, organe) și supersisteme (populații, comunități, ecosistem).

Se poate spune că a fi în viață este o proprietate emergentă a unor sisteme cu anumite compoziții, stuctură și mediu înconjurător:

- *Compoziția* include acizii nucleici și proteinele (atât cele structurale cât și cele funcționale, mai ales enzimele);
- *Structura* include abilitățile de a metaboliza, a se menține și a se autorepara (în anumite limite);
- *Mediul înconjurător* include unii precursori ai componentelor care permit auto-asamblarea în cadrul sistemului a majorității dacă nu a tuturor moleculelor ce îi intră în compoziție.

Organismul este deci un biosistem complex, însă totuși care este cel mai elementar biosistem (cea mai mică unitate a vieții)? Se postulează că un biosistem elementar este orice biosistem care nu are în componența sa niciun biosistem. Celulele sunt biosisteme elementare.

Orice biosistem compus din cel puțin două biosisteme elementare se numește biosistem compozit. Un organism este un biosistem – elementar sau compozit care nu este un subsistem al unui alt biosistem.

✓ ***Adaptarea***

Adaptarea joacă un rol important în evoluția vieții. Se pot totuși distinge o serie de concepte - *sensurile "adaptării"*.

1. *Adaptarea universală (1)* admite faptul că o ființă vie nu poate exista în afara habitatului ei. Un organism adaptat trăiește într-un anumit habitat.
2. *Adaptarea (2)* este un fenomen fiziologic în cadrul organelor de simț. Aceasta se referă la modificarea gradului de sensibilitate a organelor de simț în funcție de intensitatea stimulului.
3. *Adaptarea (3)* se referă la procesele fiziologice prin care un organism se poate adapta la un habitat în schimbare – "*adaptabilitate*".
4. *Adaptarea (4)* se referă la orice subsistem al unui biosistem care joacă un rol biologic cu biovaloare pozitivă față de mediul înconjurător.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. *Adaptarea (5)* se poate referi și la gradul în care un organism este adaptat mediului – *"adaptabilitate"*.
6. *Adaptarea (6)* se leagă de anumite caracteristici ale organismelor care apar prin procesul de selecție naturală pentru a îndeplini un anumit rol pentru perpetuarea speciei.
7. *Adaptarea (7)* este un proces de evoluție prin selecție naturală care produce o acomodare a sistemului la mediul înconjurător.

În fine, cea mai simplă *definiție a vieții* este legată de faptul că orice organism viu trebuie să posede: metabolism, creștere și perpetuare. Sistemele vii sunt definite prin abilitatea de a se auto-asambla, de a folosi energia pentru a produce ordine prin scăderea entropiei locale în detrimentul mediului înconjurător unde entropia crește.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III. SISTEME MODEL: MODELAREA ÎN CERCETAREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI ÎN PRACTICA MEDICALĂ

III.1. Modelul științific și modelarea științifică – definiții și tendințe în medicină
III.2. Etapele modelării: modelul Hodgkin-Huxley pentru transmiterea influxului nervos la nivelul axonului
III.3. Clasificarea modelelor
III.4. Modelarea teoretică, structurală și funcțională
III.5. Modelarea *in silico*. Celula virtuală
III.6. Biosenzori
III.7. Tendințe în modelarea protetică
III.8. Biomateriale și biocompatibilitate
III.9. Modele biologice
III.10. Nanotehnologie, nanobiofizică, nanomedicină

III.1. Modelul științific și modelarea științifică – definiții și tendințe în medicină

Ce este un model științific?

Modelul este un sistem prin intermediul căruia putem studia indirect, caracteristicile sau modificările unui alt sistem mai complex. Prin urmare un model va fi analogul sistemului real.

O *definiție* a modelului științific este: *modelul este un sistem teoretic sau material cu ajutorul căruia pot fi studiate indirect caracteristicile și modificările altui sistem, mai complex, cu care primul prezintă analogii.*

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modelele sunt deseori întâlnite în medicină, ele având următoarele ***scopuri***:

- facilitează accesul la cunoașterea funcțiilor și structurilor complexe ale corpului uman.
- sunt folosite în medicina experimentală.
- sunt folosite pentru a înlocui temporar sau definitiv funcțiile unor organe.
- sunt folosite pentru a se realiza proteze (dentare, articulare, de membre).

Ce este modelarea științifică?

Realizarea unui model se numește ***modelare***. Modelarea se referă la realizarea unei imitații materiale sau abstracte a unui sistem real prin construirea de modele analoge în care principiile de organizare și funcționare ale sistemului sunt reproduse.

Modelarea este utilă atunci când complexitatea unui fenomen sau a unei structuri face abordarea directă dificilă. În astfel de cazuri modelarea va facilita accesul la cunoaștere prin aceea că datele despre evenimentele originale vor fi obținute prin studiul modelului.

De obicei găsim diferite modele în știința contemporană: modelul atomic al lui Bohr, modelul mozaicului fluid membranar, modelele din științele tehnice, etc.

III.2. Etapele modelării: modelul Hodgkin-Huxley pentru transmiterea influxului nervos la nivelul axonului

Există mai multe *etape intermediare* în realizarea unui model:

1) Stabilirea *caracteristicilor fundamentale ale sistemului ce trebuie modelate* (etape mentale);
2) *Reproducerea originalului* (folosind alte materiale) la un alt nivel de organizare, ceea ce reprezintă realizarea propriu-zisă a modelului;
3) În final, *utilizarea modelului*.

Vom ilustra fiecare etapă menționată mai sus referindu-ne concret la modelul electronic al axonului. Trebuie precizat încă de la bun început faptul că vom modela doar transmiterea influxului nervos. Modelul obținut poate fi folosit doar pentru demonstrații care să susțină studiul transmiterii influxului nervos. Pentru acest model componentele axonului au fost înlocuite cu componente electronice. Baza științifică a acestei substituții a fost stabilită de ***A. Hodgkin și A. Huxley*** (***Premiul Nobel în Medicină și Fiziologie în 1963***), care au demonstrat că transmiterea influxului nervos depinde de modificările permenabilității membranei axonale.

1) În *prima etapă* a modelării trebuie să stabilim caracteristicile fundamentale ale axonului (sistemului care urmează deci să fie modelat): grosimea (diametrul) S este cuprinsă între 0,1 - 20 μm. Dacă aplicăm *legea lui Ohm* vom putea scrie:

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$R = \rho \times \frac{L}{S}$$

*unde: **R** = rezistența electrică; **r** = rezistivitatea; **L** =lungimea si **S** = grosimea axonului*

Este evident că datorită grosimii sale foarte mici axonul va avea o rezistență electrică foarte mare (aproximativ 10^{10} Ω/cm). Dacă rezistența este foarte mare atunci intensitatea curentului în lungul axonului va fi foarte mică; pentru că intensitatea, ***I***, este invers proporțională cu rezistența, ***R***:

$$I = \frac{U}{R}$$

unde: U este diferența de potențial a sursei

Dacă analizăm cele enunțate anterior ajungem la concluzia că semnalul se va pierde pe măsură ce va înainta prin axon, datorită rezistenței mari a acestuia. În realitate însă acest lucru nu se întâmplă. Ceea ce se petrece în realitate se poate explica prin faptul că membrana acționează ca un generator și un amplificator de curent.

Odată înțelese caracteristicile structurii ce va fi modelată trecem la ***realizarea modelului*** propriu-zis.

2) ***Etapa a doua, realizarea modelului.*** Pot fi create *două tipuri de modele:*

a) un model electronic,
b) și un model matematic.

*a) **Modelul electronic***

Pentru a realiza un astfel de model:

- *axoplasma* a fost înlocuită cu o rezistență (r_i);
- membrana axonală a fost modelată pri intermediul a 3 elemente în circuitul electronic:
  - o capacitate (C_m), datorită faptului că membrana poate menține o diferență de potențial între cele două fețe prin înmagazinarea a diferite tipuri de sarcină electrică pe cele două părți;
  - o rezistență (r_m);
  - o sursă de tensiune electromotoare (E_s), ce reprezintă potențialul de repaus membranar.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

b) Modelul matematic

Propagarea unui impuls electric printr-un cablu poate fi descrisă prin ecuația:

$$\frac{a}{2R} \times \frac{\Delta^2 v}{\Delta x^2} = C \times \frac{\Delta v}{\Delta x} + I(v)$$

*unde: **a** = diametrul conductorului; **R** = rezistența specifică a conductorului; **C** = capacitatea învelișului; **I(v)** = curentul dat de pasajul transmembranar al ionilor de K^+, Na^+ și Cl^- în timpul potențialului de acțiune*

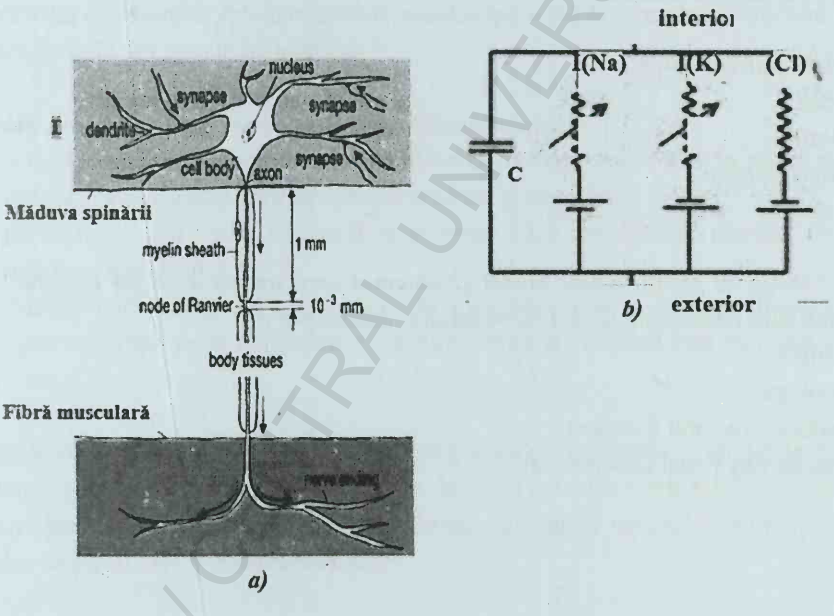


Figura III.2.1. Elementele unui neuron (a) și diagrama modelului electronic al unui fragment de axon (b) – (124)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.3. Clasificarea modelelor

Clasificarea modelelor poate fi realizată folosind trei criterii diferite:

a) în relatie cu ***scopul lor stiinţific***, modele pot fi:
- modele demonstrative (didactice)
- modele euristice (pentru cercetare)
- modele practice
- modele mixte.

b) în funcţie de structura şi forma modelului: există modele teoretice şi modele materiale.
Modelele teoretice la rândul lor pot fi clasificate în:
- fizice
- matematice
- chimice sau biochimice.

Modelele materiale sunt:
- fizice
- chimice
- fizico-chimice
- biologice.

c) în funcţie de relaţia ***dintre model şi sistemul care urmează să fie modelat***, în cazul modelelor fizice, chimice şi fizico-chimice, acestea pot fi:
- similare
- omologe
- analoge structural (bionice)
- analoge funcţional (cibernetice).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.4. Modelarea teoretică, structurală şi funcţională

Modele teoretice

Ne vom referi pe scurt la fiecare grupă principală de modele teoretice.

1. ***Modelele fizice*** au avut o deosebită importanţă în dezvoltarea cunoştiinţelor fizice. Modelele atomice sunt printre cele mai cunoscute modele fizice. *Primul model atomic, **Kelvin-Thompson***, a fost acceptat doar după ce ***Rutherford*** a dovedit, cu ajutorul experimentului său de împrăştiere a particulelor α, că atomii sunt sisteme lacunare. Acest fapt a condus la elaborarea *modelului planetar*. Printre modelele ce au urmat, îl amintim pe cel al lui ***Bohr***, care a lucrat după *modelul lui **Rutherford***, cu cele două postulate ale sale. Dacă ne referim la *modelul atomului de hidrogen al lui **Bohr***, ajungem la formula lui ***Balmer***, aflată în conformitate cu axiomele fizicii nerelativiste. ***Sömmerfeld*** a susţinut că acelaşi model ar putea fi interpretat şi în conformitate cu axiomele fizicii relativiste, conducând astfel la formula de structură fină a liniilor spectrale din atomul de hidrogen.

2. ***Modelele matematice*** pun accentul pe două aspecte esenţiale:
   a. Ca o regulă, aproape toate modelele utilizează formule matematice în prima etapă a modelării: aceasta etapă are un caracter abstract şi mental;
   b. Din ce în ce mai multe fenomene şi procese pot fi reprezentate sintetic, folosind modelarea matematică.

Modelele matematice sunt simbolice, de exemplu folosesc numere, litere şi alte simboluri, pentru a reprezenta variabilele si relaţiile dintre ele ca fiind cele mai abstracte si generale.

3. ***Formula chimică*** poate fi considerată un exemplu de model simbolic. Modelele chimice structurale s-au dovedit a fi foarte folositoare. În cazul modelelor structurale, acestea sunt structuri geometrice (construcţii) care reprezintă distribuţia spaţială a atomilor sau a grupelor de atomi care formează molecule.

Modele similare şi omologe

Modelele similare, sunt denumite si 'exacte' sau de formă inginerească, pentru că sunt cel mai des utilizate în proiectare. De exemplu, un avion sau un model de navă este copiat cu acurateţe existând doar o diferenţă de dimensiune (de scală). Modelele similare sunt utilizate, de asemenea, în medicină, în cazul sistemelor complexe de aparate.

Modelele omologe sunt acelea în care doar câteva detalii ale structurii modelului corespund originalului. Pot fi utilizate, de exemplu, modele de gelatină pentru a modela anumite proprietăţi fizico-chimice a citoplasmei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modelarea structurală analogă sau bionică

Majoritatea tipurilor de modele sunt realizate prin apelarea la analogii cu obiectul sau structura modelată. Prin analogie, înţelegem că studiul unui fenomen sau structuri se supune aceloraşi legi, diferenţa făcând-o faptul că sunt mai accesibile din punct de vedere experimental.

Un exemplu de experiment care se bazează pe analogie este cel al lui ***Marey***, care demonstrează rolul elasticităţii arteriale asupra fluxului sanguin. Aparatul utilizat în acest scop este confecţionat dintr-un vas de sticlă prevăzut cu tub elestic, de forma literii U, continuat cu două tuburi cu diametre egale, unul din tuburi fiind rigid, făcut din sticlă, iar celălalt este elastic.

Ambele tuburi sunt plasate orizontal, la acelaşi nivel, pe un plan. Cu ajutorul unei pârghii se comprimă tubul în formă de U. Extremităţile tuburilor sunt curbate, astfel încât lichidul scurs din ele să poată fi colectat în diferite vase. Introducem apa în vas, după ce se dă drumul fluxului de apă se comprimă ritmic tubul în formă de U. Vom observa existenţa unui flux intermitent prin tubul rigid, unde există de asemenea şi un volum de apă mai mic decât în tubul elastic. Explicaţia găsită este că atunci când se comprimă tubul în formă de U, o parte din energia mecanică experimentală este stocată în pereţii tubului elastic, adică pereţii se dilată. Atunci când asupra tubului elastic nu mai este exercitată compresia, acesta revine la forma sa iniţială, comprimând astfel coloana de lichid. Fenomenul nu are loc în cazul tubului rigid. Consecinţa este fluxul continuu, cu un volum de lichid mai mare, prin tubul elastic. Circulaţia arterială în corpul uman are un comportament asemănător.

Dacă facem ***analogia*** urmărind în detaliu ***structura*** obiectului de modelat, procesul se va numi *modelare structurală sau bionică*. Când scopul este doar de a obţine un rezultat similar cu ceea ce se întâmplă în sistemul modelat, fără a exista şi o asemănare structurală cu obiectul de modelat, modelarea analogă este în acest caz va fi una de *tip funcţional sau cibernetic*. Reconsiderând modelarea unui fragment axonal, observăm că aceasta poate fi realizată în ambele moduri.

Modelarea structurală sau bionică este larg răspândită la ora actuală, ca urmare a dezvoltării bionicii, care a început în jurul anului 1960. Termenul de ***bionică*** a fost introdus de ***Steele*** si provine din alăturarea celor două ramuri, ***biologie*** şi ***electronică***. Rolul bionicii ar trebui să fie acela de a transpune principiile de funcţionare a sistemelor vii performante în stiinţă şi tehnologie. Unele organisme pot fi considerate aproape perfecte, în relaţie cu propriile procese de evoluţie (miliarde de ani de evoluţie continuă). Aceasta se referă la transmiterea informaţiei, cu un consum scăzut de energie, într-un timp scurt.

Cele mai importante ***direcţii in bionică*** sunt:

a. modelarea de organe senzoriale
b. modelarea de mecanisme efectoare
c. modelele medicale bionice
d. biotehnologia, etc.

POLIMIRI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În acest curs vom dezvolta doar unele aspecte de mare importanţă pentru medic.

a. În ceea ce priveşte ***modelarea organelor senzoriale***, putem enumera unele organe senzoriale pentru modelare care sunt de interes: mecano-receptori, receptorii optici (fotoreceptori), receptorii chimici (chemoreceptori), receptorii termici (termo-receptori), receptorii electrici (electro-receptori).

b. Modelarea ***mecanismelor efectoare*** este un deziderat datorită eficienţei lor foarte înalte; de exemplu, randamentul utilizării biochimice a energiei este optimizat, ceea ce înseamnă că organismele vii acţionează în conformitate cu răspunsurile de adaptare, fără pierderi de energie.

c. ***Modelele medicale bionice*** sunt în permanentă dezvoltare. Putem lua în considerare trei tipuri de modele medicale de importanţă practică, care vor fi considerate bionice pentru că reproduc parţial, în conformitate cu structura lor, organe din corpul uman. Acesta este cazul rinichiului artificial, al sistemului cord-pulmon artificial şi cel al inimii artificiale.

Primul tip de ***rinichi artificial*** a constat dintr-un tub lung (20 m), confecţionat din celofan. Sângele pacientului este luat dintr-o arteră şi se varsă în tub. Întregul tub este scufundat într-o soluţie izotonică. Principiul dispozitivului se bazează pe faptul că membrana de celofan este folosită pentru a înlocui membrana glomerulară normală datorită *caracteristicilor sale structurale*:

Tabelul III.4.1. Comparaţie între caracteristicile membranei glomerulare şi a porilor de celofan

	Membrana glomerulară	*Celofan*
Diametrul porului	30 - 45 Å	30 Å
Lungimea porului	1 μm	80 μm
Suprafaţa totală a membranei	1500 - 7500 cm^2	22000 cm^2

După cum putem vedea, diametrul porilor este acelaşi atât pentru membrana glomerulară cât şi pentru cea din celofan, astfel încât doar moleculele mici pot trece prin ambele tipuri de membrane. În cazul membranei de celofan, lungimea porului este mai mare, ceea ce înseamnă că se poate obstrua uşor. Dar acest defect este compensat de suprafaţa mai mare a membranei de celofan. Procesul de dializă se realizează în 2-3 ore. Astăzi, este posibilă reducerea timpului în care se realizează dializa, folosind o metodă în care sângele şi soluţia izotonă se varsă în contracurent.

Eficienţa dializei poate fi apreciată prin conductometrie (măsurarea rezistenţei şi conductivităţii soluţiei izotone la anumite intervale de timp).

În cele din urmă sângele este colectat şi reintră în corpul pacientului printr-o venă (a se vedea, de asemenea în cartea de lucrări practice, capitolul ***Dializa***).

USMF CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sistemul cord-pulmon are scopul de a înlocui, pentru o perioadă scurtă de timp (de obicei câteva ore), funcţia de pompă a inimii, precum şi funcţii precum cele de a reţine oxigen şi elimina CO_2, care fiziologic sunt realizate prin membrana alveolo-capilară.

Inima artificială constă în înlocuirea permanentă a inimii de către un dispozitiv mecanic. O inima artificială implantabilă are, în principiu, un circuit biologic şi un dispozitiv care înlocuieţte ventriculii naturali, constând fie din saci care pulsează, fie dintr-o pompă. Există diferite mecanisme de punere în funcţiune a unei inimi artificiale implantabile. În acest scop, la ora actiuală, sunt utilizate motoare electrice de mici dimensiuni sau nucleare. Aceste motoare sunt comandate de către un microcalculator electronic, care se ataşează la pacient.

d. ***Biotehnologia*** se referă la toate aplicaţiile cunoştinţelor din biologie (biologie moleculară, microbiologie, genetică, biochimie, biofizică) în industrie. Cea mai mare parte a industriei alimentare se bazează pe cunoştinţe din biologie şi poate deci intra sub denumirea de biotehnologie. Biotehnologia este in mod evident legată de bionică.
A se vedea si slide-urile de la cursul ***Biotehnologie***.

Modelarea analogă funcţională: modele cibernetice

Modelele cibernetice sunt unice prin faptul că prezintă autoreglare, datorită feedback-ului. Un exemplu de aparat medical rezultat prin folosirea unui astfel de model este stimulatorul cardiac care substituie în cazul unor afecţiuni cardio-vasculare funcţia nodulului sino-atrial. Pace-makerului este de obicei situat sub pielea pacientului şi printr-o sondă plasată în cord trimite impulsuri cu un ritm fiziologic (a se vedea şi ***Capitolul III.7. Tendinţe în modelarea protetică)***.

Un alt astfel de exemplu este un aparat care înlocuieşte funcţia de transductor a nervului lui ***Hering***. Acesta porneşte din sinusul carotidian şi după un traiect scurt intră în componenţa celui de-al IX-lea nerv cranian. Stimularea nucleului central al acestui nerv duce la modificări de tensiune arterială. Pentru modelarea acestui fenomen se poate folosi un cristal piezoelectric aplicat direct pe artera carotidă pentru a putea transforma tensiunea arterială într-una electrică (***H. R. Warner***). Curentul rezultat poate fi introdus într-un calculator care poate la rândului lui interpreta acest semnal şi trimite impulsuri electrice către nervul lui ***Hering***. Eletrozii de stimulare sunt aplicaţi pe nervul sinusal şi rezultatul este că o creştere a frecvenţei impulsului electric va duce la o relaxare a musculaturii netede care va determina scăderea presiunii arteriale. Pe scurt, cristalul piezoelectric transformă variaţiile de presiune sanguină în variaţii ale curentului electric, apoi semnalul este amplificat şi ajunge la un calculator analog care comandă stimularea nervului ***Hering*** în funcţie de informaţiile primite.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.5. Modelarea *in silico*. Celula virtuală

✓ ***Construcţia celulelor 'in silico'***

Celulele sunt biosisteme complexe şi înţelegerea fucţionării lor este de bază în întelegerea patologiei. O nouă abordare a complexităţii lor devine, astăzi, posibilă prin simularea pe computer. În ***Japonia***, ***Masaru Tomita*** si grupul său au dezvoltat un soft de simulare ce poate reproduce, într-o formă simplificată, procesele biochimice complexe a unei celule. Soft-ul se numeşte *E-CELL*: a fost simulată o celulă ipotetică, cu 127 de gene (setul minimal pentru o celulă în sistemul lor computerizat), plecând de la exemplul informaţiei genetice a *Mycoplasma genitalium* (un microb ce deţine cel mai mic set de gene cunoscut pentru orice organism capabil de auto-replicare). Celula simulată virtual 'trăieşte' menţinând un metabolism simplu şi stabil: preia glucoză de la mediul de cultură virtual, generează enzimele şi proteinele pentru a susţine procesele interne ale celulei şi exportă deşeurile produse. Este suficientă modificarea, din calculator, a concentraţiei unei anumite molecule, şi în câteva momente toate modificările biochimice din interiorul celulei pot fi văzute pe ecran! O deosebită importanţă în înţelegerea bolilor va avea atunci când, pe baza unui astfel de program, va fi simulată o celulă a unui organism real.

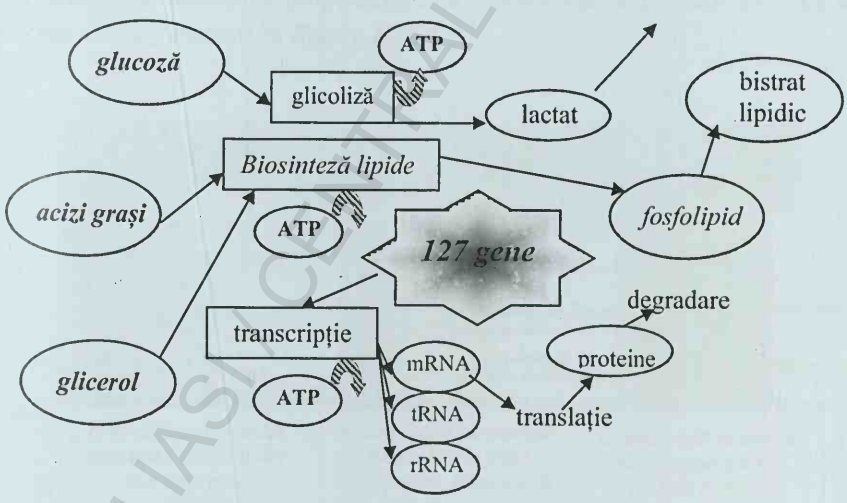


Figura III.5.1. Modelul celulei virtuale E-CELL (49)

O altă simulare virtuală pe computer a unei celule a fost dezvoltată în ***Conneticut***, de către ***L. Loew*** şi ***J. Schaff***, permiţând studierea formei, volumului şi a altor caracteristici biofizice celulare. Acest model se numeşte ***Virtual Cell***; a fost construit folosind măsurători

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

precise ale modului în care moleculele difuzează şi reacţionează în interiorul celulelor vii. Aceste măsurători au fost făcute prin marcarea moleculelor cheie şi observarea lor cu un microscop conectat la un sistem de înregistrare video. Rezultatul a fost o celulă virtuală, cu proprietăţi fizice asemănătoare cu cele ale unei celule reale. Sunt simplu de observat efectele produse de modificarea concentraţii ionice (de exemplu, a calciului). ***Virtual Cell*** va rezolva ecuaţiile, descriind reacţiile şi rata de difuzie pentru moleculele influenţate de calciu, realizân un fel de 'film' al procesului metabolic.

Aceste două simulări celulare se pot completa reciproc foarte bine.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.6. Biosenzori

Biosenzorii sunt dispozitive hibride (realizate dintr-o structură vie şi un dispozitiv sau structură nevie) utilizate pentru detectarea şi măsurarea parametrilor din organismul viu.

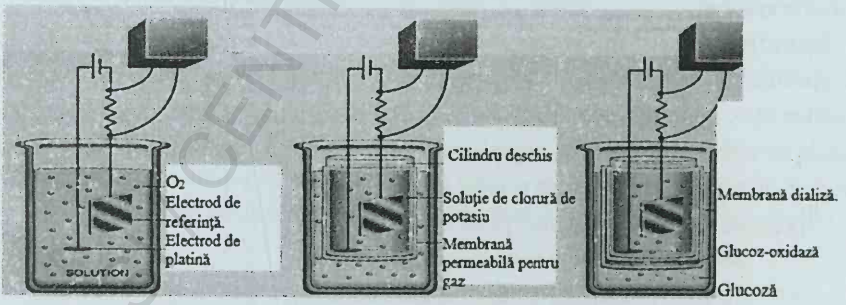
Istoria biosenzorilor începe în anul 1950 (***L. Clark***, *Spitalul de Pediatrie*, ***Cincinnati***), atunci când a fost inventat un electrod pentru care măsura, *in vitro*, concentraţia de oxigen din sânge. Între doi electrozi (unul de platină şi celălalt de referinţă) introduşi într-un probă de sânge, peretele despărţitor fiind realizzat dintr-o membrană din material plastic permeabilă pentru gaze, a fost aplicată o diferenţă de potenţial. Intensitatea de curent măsurată este dependentă de viteza de difuzie transmembranară a oxigenului, care la rândul ei este proporţională cu concentraţia de oxigen din sânge.

În 1962, ***Clark*** a adaptat electrodul de oxigen pentru a măsura concentraţia de glucoză din sânge, primul biosenzor utilizat fiind realizat în 1967, de către ***Updike*** şi ***Hocks*** (biosenzorul de glucoză).

✓ ***Biosenzorul de glucoză***

Scopul acestui dispozitiv este de a măsura concentraţia de glucoză din sânge. Este compus din doi electrozi, unul din platină, celălalt de referinţă, separaţi de sânge printr-un gel care conţine o enzimă (glucoz-oxidază), şi printr-o membrană externă de dializă, semi-permeabilă.

Glucoza străbate membrana de dializă şi este oxidată de oxigenul consumator de glucoz-oxidază. Cantitatea de oxigen consumată este indirect evaluată (prin concentraţia de oxigen rămasă), aceasta fiind proporţională cu concentraţia de glucoză. Evoluţia senzorului de glucoză este reprezentată în ***Figura III.6.1.***



Intensitatea curentului care trece între cei doi electrozi este proporţională cu concentraţia oxigenului în soluţie

O membrană permeabilă pentru gaz în jurul electrozilor, îi separă de mediul biologic, dar permite difuzia oxigenului într-o soluţie de clorură de potasiu

O membrană de dializă care conţine glucoz-oxidază permite transformarea glucozei în acid gluconic cu consum proporţional de oxigen

Figura III.6.1. Dezvoltarea iniţială a biosenzorilor de glucoză

Astăzi, un biosenzor de glucoză este reprezentat de un dispozitiv subţire implantat hipodermic. Glucoza din sânge difuzează în biosenzor dislocuind câteva molecule de dextran

marcate cu fluoresceină (existente pe peretele intern al biosenzorului). Printr-o fibră optică este transmis un fascicul laser pentru a excita moleculele libere de dextran. Fluorescenţa obţinută trebuie să fie proporţională cu concentraţia de glucoză din sânge.

✓ ***Principiul biosenzorilor***

Biosenzorii pot fi definiţi ca nişte sisteme de detectare şi evaluare cantitativă a unor parametri din organismele vii, alcătuiţi din două părţi: o structură vie (numită bioreceptor) şi o parte electronică (numită transductor), reprezentate în ***Figura III.6.2.***

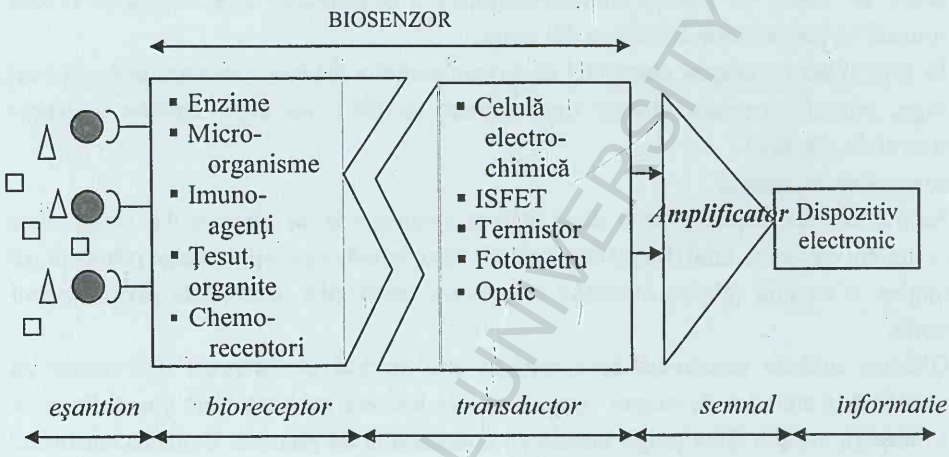


Figura III.6.2. Diagrama biosenzorului

✓ ***Bioreceptorul***

Reprezintă partea 'vie' în care molecula care urmează a fi măsurată este recunoscută în mod specific si transformată. În general, bioreceptorul poate include: enzime, celule, antibiotice etc., imobilizate pe un anumit suport. Bioreceptorul dă o reacţie, în principiu, cu molecula ce trebuie măsurată în organismul viu. Rezultatul acestei reacţii va fi recunoscut şi tradus într-un semnal electronic la nivelul transductorului.

Exemple de tipuri de bioreceptori:

- electrozi enzimatici nemediaţi ampermetric
- electrozi enzimatici mediaţi ampermetric
- imunoelectrozi
- dispozitive care măsoară conductanţa sau impedanţa
- microorganisme (biosensori microbieni)
- sensori termometrici
- ţesut vegetal sau animal
- chemoreceptor, etc.

Bioreceptorul trebuie să fie în contact cu mediul care conţine specia moleculară care urmează a fi măsurată şi trebuie să conţină un situs foarte selectiv pentru această moleculă, pentru a asigura o detecţie specifică. De exemplu o enzimă, în cazul biosenzorilor enzimatici.

BCU "I. CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Această enzimă imobilizată trebuie să transforme specia moleculară care urmează a fi măsurată într-un răspuns detectabil pentru traductor.

✓ ***Transductorul***

Partea în care răspunsul bioreceptorului legat specific de moleculă este transformat într-un semnal electric. Se poate spune că transductorul asigură conversia energiei dintr-un tip de energie în altul. Între bioreceptor și traductor trebuie să existe compatibilitate. Nu putem utiliza un transductor termometric dacă reacția de transformare în bioreceptor nu determină variația entalpiei.

Transductorul poate fi: o celulă electrochimică (ampermetrică sau potențiometrică), semiconductor (ISFET), dispozitiv termometric, fotometru, fibre optice, dispozitive piezoelectrice, dispozitive chimiomecanice.

✓ ***Etape pentru realizarea biosenzorului***

Pentru a realiza un biosenzor trebuie respectați anumiți pași:

➢ *pentru a-l crea, se stabilesc natura și caracteristicile bio-receptorilor*

- obținere – prin biologie moleculară,
- caracteristici – bioreceptorul trebuie să recunoască și să măsoare o anumită moleculă folosind un efect fizico-chimic detectabil de către un transductor (imunologic, biocataliză, chemorecepție),
- natura bioreceptorului - enzime, microorganisme, celule, țesuturi, antigeni, chemoreceptori.

➢ *alegerea transductorului, în relație cu:*

- tipul reacției, semnalul obținut,
- criteriul de biocompatibilitate,
- dimensiunile mici,
- efectele secundare.

➢ *conectarea bioreceptorului cu transductorul:*

- fixare fizică pe matrice (enzime)
- imobilizare imunologică
- imobilizare între două membrane semipermeabile (țesuturi, celule).

În sinteză se poate spune că biosenzorii sunt:

- *Dispozitive hibride (incluzând două parți: vie + nevie)*
- *Folosiți pentru detecția și înregistrarea diferiților parametri ai corpului*
- *Principiu: conversia unui fenomen sau a unei proprietăți fizice a organismului în semnal electric*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ *Tipuri de biosenzori*

Cele mai importante tipuri de biosenzori sunt:

- biosenzorii enzimatici
- biosenzorii microbieni
- biosenzorii imunologici
- biosenzorii bazaţi pe ţesuturi vegetale sau animale.

Biosenzorii pot fi utilizaţi în diferite domenii: biomedicină, industrie agro-alimentară, protecţia mediului etc.

✓ *Biosenzori utilizaţi în biomedicină*

Unul dintre cele mai folosite tipuri de biosenzori este *biosenzorul enzimatic*, datorită specificităţii şi utilizării sale facile. Din această cauză, interesul major îl reprezintă utilizarea biosenzorului de glucoză în monitorizarea cantitativă a nivelului de glucoză din sânge şi urină, oferind informaţii despre eficacitatea tratamentului diabetului zaharat. În prezent există două abordări în reglarea terapeutică a nivelului de glucoză din sânge la pacienţii diabetici: *tratament deschis,* în cadrul căruia dozele de insulină injectate sunt predeterminate, fără verificări repetate ale nivelului de glucoză din sânge, şi *sistemul închis*, unde dozarea insulinei injectate depinde, de fiecare dată, de determinarea anterioară a concentraţiei de glucoză din sânge. În acest caz este necesar un biosenzor enzimatic de glucoză, pentru monitorizarea continuă a nivelului de glucoză din sânge, modelând funcţia pancreasului, asemenea unui pancreas artificial.

Mai sunt utilizaţi şi alţi biosenzori pentru dozarea anumitor metaboliţi ai sângelui, cum ar fi ureea şi creatinina în management-ul funcţiei renale, sau dozarea colesterolului pentru prevenirea aterosclerozei etc.

Dintre celelalte tipuri de biosenzori, cei mai utilizaţi ar fi biosenzorii imunologici în relaţie cu specificitatea imunologică; de exemplu pentru unele dozări de medicamente, dozarea unor hormoni (în sarcină, HCG), a unor antigeni specifici în cancer sau alte boli cum ar fi hepatita B.

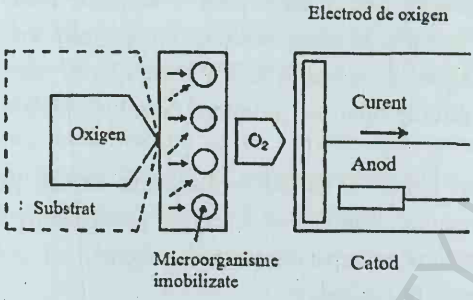
✓ *Biosenzori microbieni*

Aceşti tipi de biosenzori sunt formaţi din combinaţia unor microorganisme (imobilizate într-o membrană) cu dispozitive electrochimice. Biosenzorii microbieni sunt potriviţi pentru controlul proceselor biochimice şi se pot clasifica în:

- biosenzori care măsoară activitatea respiratorie: în acest caz schimbări în activitatea respiratorie a microorganismelor aerobe cauzate de asimilare sunt detectate de un electrod de oxigen, iar din aceste schimbări sunt estimate concentraţiile de substrat (***Figura III.6.3.***)
- măsurători electrochimice ale metabolismului activ: poate detecta diferite substanţe secretate de microorganisme (H_2,CO_2, NH_3, acizi organici).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a) Măsurători ale activităţii respiratorii cu ajutorul unui biosenzor microbian



b) Măsurători ale metaboliţilor cu ajutorul unui biosenzor microbian

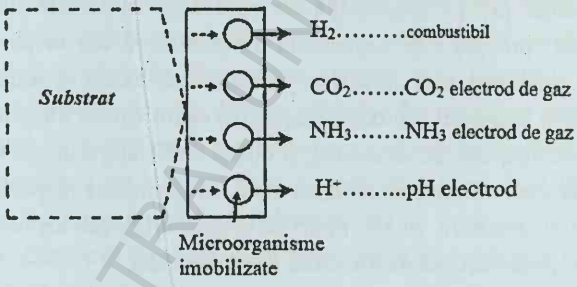


Figura III.6.3. Diagrama biosenzorilor microbieni (11)

Au fost dezvoltate mai multe tipuri de biosenzori microbieni şi câţiva dintre ei au aplicabilitate în monitorizarea mediului şi în industria alimentară.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.7. Tendinţe în modelarea protetică

Înlocuirea organelor sau a unor părţi a corpului uman cu proteze, reprezintă o procedură foarte des întalnită în zilele noastre. Proteza este un dispozitiv special proiectat pentru a înlocui un organ, un membru sau o parte a unui membru vătămat. Ca materiale protetice se folosesc diferite tipuri de polimeri, ceramice, metale, care poartă denumirea de biomateriale.

Un ***biomaterial*** trebuie să posede următoarele calităţi pentru a putea fi utilizat: a) trebuie să fie biocompatibil (netoxic, necanceros, nerejectabil); b) trebuie să aibă un grad înalt de fiabilitate (pentru evitarea denaturării protezei); c) trebuie să posede proprietăţi mecanice şi chimice specifice utilizării.

În prezent, principalele scopuri ale cercetării biomaterialelor sunt:

- analiza materialelor ce intră în contact cu ţesutul viu;
- calităţile morfologice ale protezei;
- studiul privind comportamentul materialului din punct de vedere mecanic cât şi îmbătrânirea acestuia.

În cazul membrelor, sunt deja disponibile, proteze inteligente care folosesc comenzi bioelectrice, adică preiau biopotenţialele care apar în terminaţiile nervoase din bontul amputat. Aşadar, proteza este comandată de centrul nervos al pacientului. Acelaşi sistem bioelectric de comandă este folosit şi atunci când există o intrerupere patologică între neuronii motori şi organele efectoare (muşchii); o atrofie musculară poate fi astfel evitată.

Au fost construite, de asemenea, şi mâini artificiale, comandate de la distanţă pentru a fi capabile să susţină obiecte, să conducă nave, să controleze dispozitive ce se află în contact cu anumite reacţii nucleare. Si alte tipuri de organe artificiale au fost proiectate (de exemplu ochii artificiali, pielea artificială, rinichiul artificial, etc.).

Există câteva tipuri de proteze sau sisteme de proteze care se bazează pe conversia mesajelor senzoriale: proteze auditive sau proteze care asigură simţul tactil. Un anumit tip de mesaje corespunzătoare unui simţ, pot fi transformate în alt tip de mesaje, adecvate simţului deficitar.

Posibilităţile si tendinţele în modelarea protetică se dezvoltă cu rapiditate. A se vedea si slide-urile de la cursul ***Biotehnologie (Omul bionic)***.

✓ ***Dispozitive electromedicale***

Stimulatoarele electrice sunt foarte utilizate în medicină, de exemplu în fizioterapie pentru exerciţiul muşchilor, sau în anestezie pentru a testa relaxarea musculară în timpul operaţiei, urmărind răspunsul la stimulare a nervului periferic. Stimularea nervului periferic este folosită chiar şi in terapie, pentru alinarea durerii.

O gamă largă de stimulatoare electrice este reprezentată de stimulatoarele cardiace.

✓ ***Stimulatoare cardiace (pacemakers)***

Acestea sunt dispozitive care folosesc impulsurile electrice pentru a reproduce sau a regla ritmul inimii. Se bazează pe baterii şi sunt conectate la inimă prin electrozi şi sonde. Pot

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fi temporare sau permanente. Pot fi introduse intravenos, transcutanat, epicardiac, prin esofag sau artera coronară. Majoritatea stimulatoarelor cardiace sunt declanşate sau inhibate pentru a modifica semnalul rezultat din analiza potenţialului uneia sau mai multor camere cardiace. Ele au un anumit grad de programabilitate şi pot avea, de asemenea, funcţii antitahicardice. Este utilizat un cod de cinci litere pentru a clasifica stimulatoarele cardiace prin combinarea acestor caracteristici.

Stimulatoarele cardiace sunt folosite şi ca defibilatoare, pentru a stimula direct muşchiul cardiac. Stimulatorul cardiac corectează anomaliile ritmului cardiac şi defibrilatorul restabileşte ritmul sinusal normal într-o inimă aflată în fibrilaţie.

✓ *Principiu*

După cum ştim, în mod normal, contracţia ritmică a inimii este determinată şi menţinută de potenţialele de acţiune, care îşi au originea în nodul sinoatrial, primul stimulator natural al inimii. Ritmul impus de nodul sinoatrial poartă numele de ritm sinusal.

Inima poate fi stimulată, de asemenea, prin aplicarea unui curent electric extern, pentru o scurtă perioadă de timp, şi apoi repetând acest proces o dată pe secundă. A fost demonstrat că aplicând curentul direct pe cord printr-o pereche de electrozi, curentul necesar este de doar câţiva miliamperi şi poate fi furnizat de o baterie. Această observaţie a stat la baza stimulatoarelor cardiace numite *pacemaker*. Primele astfel de stimulatoare cardiace, folosite la începutul anilor 1950, erau dispozitive externe care trimiteau curentul prin electrozi situati cutanat (pe torace). Acestea au fost eficiente dar necesitau curenţi mari care provocau durere pacientului. Primul stimulator implantat a fost descris în 1958, prin operaţie pe cord, manevră care prezenta însă anumite riscuri. Peste câţiva ani, în 1965, necesitatea operaţiilor mari a fost eliminată prin introducerea electrozilor prin vena cavă în atriul drept, şi apoi în ventriculul drept. Din acel moment s-au făcut multe îmbunătăţiri stimulatoarelor cardiace insă principiul lor nu s-a schimbat.

În prezent, sunt implantate peste 250 000 de dispozitive în întreaga lume, în fiecare an.

Tabel III.7.1. Coduri generice ale stimulatoarelor cardiace (NBG)

Poziţie	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V*
Categorie	*Cavitatea stimulată*	*Cavitatea al cărui ritm este cules*	*Răspunsul senzorului*	*Programabilitate, rata de modulare*	*Funcţie antitahiaritmică*
	O = nici unul A = atriu V = ventricul D = dual (A+V)	O = nici unul A = atriu V =ventricul D = dual (A+V)	O = nici unul T =stimulare (trigger) I = inhibare D = dual (T+I)	O = nici unul P = programabil M = multiprogramabil C = comunicare R = rata de modulare	O = nici unul P = stimulare S = şoc D = dual (P+S)

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

✓ ***Principalele componente dintr-un stimulator cardiac***

Un stimulator cardiac trebuie să conţină un generator de impulsuri (cu o baterie) şi electrozi. În prezent, stimulatoarele cardiace aplică un impuls electric de 10 mA amplitudine şi 1ms durată. Acest impuls se aplică prin doi electrozi, catodul fiind electrodul plasat în ventricul. Rezistenţa electrozilor şi a ţesutului fiind de aproximativ 500 Ω, puterea necesară, în timpul aplicării impulsului, trebuie să fie:

$$\textbf{Puterea} = I^2R = 5 \times 10^{-2}\ \textbf{mW} = 50\ \textbf{mW}$$

În acest caz, bateria care alimentează stimulatorul cardiac este una de 5 V (10 mA x 500 Ω). Este posibil calculul capacităţii bateriei în *amperi-ore* (Ah). În cazul prezentat bateria poate fi utilizată 11 ani, ceea ce înseamnă că pacientul poate beneficia de acest dipozitiv şi să aibă un ritm cardiac anormal pentru o lungă perioadă de timp (corectabil cu ajutorul pacemakerului) folosind o baterie foarte mică!

✓ ***Tipuri de electrozi***

În cazul stimulatoarelor cardiace s-au folosit multe tipuri de electrozi, alcătuiţi din metale ca: platina, argintul, oţelul inoxidabil, titanul sau electrozii de carbon. Electrodul trebuie perceput ca un transductor pentru că trebuie să permită mişcarea electronilor prin firele stimulatorului cardiac care va da naştere fluxului de ioni celulari, ce va determina apoi apariţia potenţialului de acţiune.

Reacţia trebuie să fie stabilă şi netoxică. Suprafaţa electrozilor variază între 10 şi 100 mm^2. Indiferent de caz trebuie inserat un condensator în serie cu generatorul extern de impulsuri.

✓ ***Sursele de alimentare***

Sursa de alimentare ideală ar trebui să fie foarte mică, să aibă un timp de viaţă lung, să nu fie afectată de temperatura corpului, uşor de setat, ieftină şi să dea o putere (output) de 5 V. Tipurile de surse care au fost utilizate includ: celule de mercur, generatoare termoelectrice cu propulsie nucleară şi celule litiu-ion (cele mai utilizate în prezent).

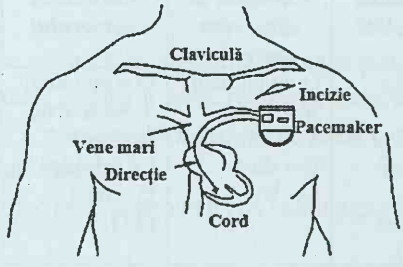


Figura III.7.1. Diagrama unui stimulator cardiac. Sonda trecută prin vena subclaviculară din stimulatorul cardiac şi ghidată sub control radiografic în inimă (11)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

✓ ***Tipuri de stimulatoare cardiace***

Prima clasificare este în raport cu terminologia: stimulatoare cardiace naturale si artificiale.

Pacemakerele naturale reprezintă grupul de celule care inițiază bătaia ritmică a inimii, caracterizată fiziologic de o pierdere lentă a potențialului membranei în timpul diastolei. De obicei, stimulul care impune ritmul cardiac este nodul sinoatrial.

Pacemakerele artificiale sunt reprezentate de întregul stimulator cardiac artificial, de exemplu toate dispozitivele care utilizează impulsuri electrice pentru a reproduce sau pentru a regla ritmurile cardiace.

Din punct de vedere al poziționării, majoritatea stimulatoarelor sunt interne însă există și stimulatoare cardiace externe.

Stimulatoare cardiace interne: acestea sunt implantate, generatorul de puls fiind fixat, printr-o mică incizie, de obicei, sub clavicula dreaptă sau stangă. Sondele interne, în acest caz trebuie să ajungă în inimă prin vena cefalică.

Stimulatoare cardiace externe: în acest caz, generatorul de puls este în afara corpului și electrozii sunt fixați fie pe miocard sau în miocard. Aceste tipuri pot fi utilizate în cazul pacienților cu aritmie cardiacă temporară din perioadele post-operatorii.

Funcție de tipul de stimulare, stimulatorul cardiac poate avea: ritm fix (numit și ritm competitiv, în care ritmul cardiac impus este fix, neinfluențat de procesele interne) și ritm necompetitiv. În ritmul necompetitiv, stimulatorul cardiac înregistrează automat ECG-urile și produce un ritm de ieșire corelat cu unda P (pacemakere cu trigger atrial) sau unda R (pacemakere cu trigger ventricular). Există, de asemenea, posibilitatea stimulator cardiac de tip necesitate, unde un puls de ieșire este produs doar în absența unei unde R, naturale; unda R este folosită pentru a inhiba declanșarea stimulatorului cardiac. Cele mai folosite tipuri de stimulatoare cardiace sunt cele ventriculare.

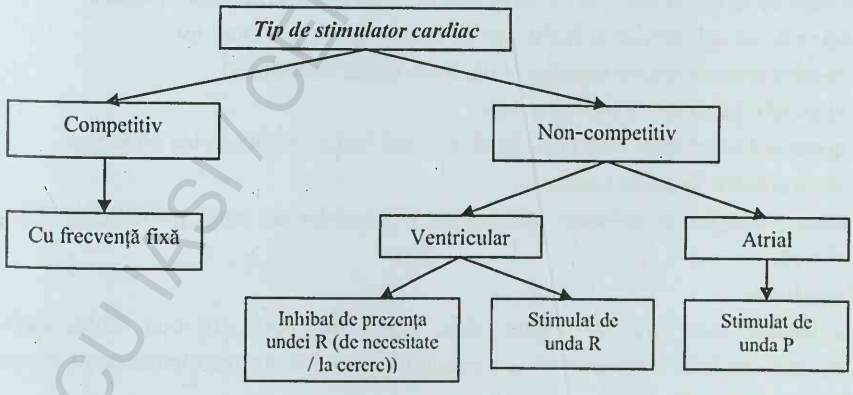


Figura III.7.2. Tipuri de stimulatoare cardiace (pacemakere)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.8. Biomateriale şi biocompatibilităţi

Biomaterialele sunt materiale de origine naturală sau produse de om, care sunt utilizate pentru a suplimenta sau a înlocui funcţiile ţesutului viu. (*J. Black*, 1992).

Un biomaterial se numeşte „biocompatibil" atunci când este capabil să reziste în mediul fiziologic fără a determina apariţia efectelor adverse semnificative din partea corpului sau să apară denaturări ale materialului.

Printre primele biomateriale folosite se numără şi metalele pentru fixarea fracturilor ooase (prima menţiune este în 1775), dar marea majoritate a descoperirilor au avut loc în ultimii 30 de ani, făcând posibilă înlocuirea aproape oricărei părţi a corpului uman, parţial sau total. În afara dispozitivelor implantabile există, de asemenea, un număr de sisteme extra-corporeale care intră în contact cu sângele pacientului, incluzând rinichiul artificial sau sistemele cord-pulmon artificial. Unele dispozitive sunt destinate uzului temporar (ex. proteze pentru fixarea osului), altele sunt definitive şi permanente (valve cardiace, grefe vasculare, proteze articulare etc.).

✓ ***Tipuri de biomateriale şi proprietăţile lor***

Există câteva tipuri principale de biomateriale: metalele, polimerii, cele pe bază de carbon şi materialele ceramice.

Metalele

Principala utilizare a metalelor este în fabricarea implanturilor ortopedice, în prezent, în acest scop se utilizează oţelul inoxidabil sau aliajele de titan. Sunt testate şi alte combinaţii de metale. Toate implanturile metalice sunt mai dense, mai puternice şi au un grad de elasticitate mai mare decât osul.

Polimerii

Sunt materiale cu molecule cu lanţ lung şi greutate moleculară mare formate din monomeri care se repetă şi care pot fi clasificaţi în elastomeri şi materiale plastice.

Proprietăţile polimerilor utilizaţi sunt în concordanţă cu scopul lor:

- combinarea diferiţilor monomeri pentru a forma copolimeri,
- controlul gradului de polimerizare,
- controlul numărului legăturilor ionice dintre lanţurile polimerice adiacente,
- incorporarea de aditivi chimici.

Câteva exemple de polimeri utilizaţi ca şi biomateriale sunt: polietilena, siliconul, hidrogelurile etc.

Ceramicele

Majoritatea sunt structuri legate ionic cuprinzând una sau mai multe elemente metalice cu una sau mai multe elemente nemetalice. Ceramicile resorbabile sunt proiectate pentru a fi treptat înlocuite de os.

Biomateriale pe bază de carbon

Devin din ce în ce mai utilizate în domeniul medical.

Sunt diferite tipuri disponibile: carbon vitroase, carbon pirolitice, asemănătoare diamantului şi fibre de carbon.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hemocompatibilitatea

Evaluarea compatibilităţii sânge-material poate fi făcută prin simpla plasare a unui volum determinat de sânge pe suprafaţa probei şi observarea: timpului de coagulare, greutatea cheagului, numărul de trombocite aderente, absorbţia de proteine (prin utilizarea proteinelor marcate cu ^{125}I). Toate testele trebuie efectuate în paralel cu materiale de control adecvate cu proprietăţi de hemocompatibilitate cunoscute.

Testele de toxicitate

Pot fi efectuate folosind culturi de celule. Celule, cum ar fi fibroblastele, pot fi crescute în vase Petri unde se află şi materialul de testat. Toxicitatea este estimată în funcţie de gradul de inhibare a creşterii celulare sau prin măsurarea morţii celulare.

Modele in vivo şi studii clinice

Materialele care prezintă comportament favorabil la testele *in vitro* sunt apoi evaluate pe modelele *in vivo*, ex. modelele animale. Cele mai utilizate proceduri implică implantarea materialului de testat direct în ţesuturile unor tipuri de animale, sacrificiul animalelor şi examinarea având loc la intervale de timp potrivite. Toxicitatea poate fi evaluată şi prin implantarea materialelor sub pielea şobolanilor sau a şoarecilor şi evaluarea histologică ulterioară a răspunsului ţesutului. Cu toate acestea, evaluarea finală poate fi făcută doar după implantarea în corpul uman, în studii atent controlate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.9. Modele biologice

În medicină, experimentele pe subiecţi umani nu sunt permise. Din acest motiv, pentru a înţelege mecanismele bolilor şi pentru a studia acţiunea unor medicamente în tratamentul maladiilor, modelele biologice sunt larg utilizate. Acesta este cazul modelelor animale (artificiale şi naturale) pentru studii *in vivo* pe şoareci, iepuri, maimuţe, etc.

De exemplu, ficatul şoarecului este una dintre cele mai utilizate surse pentru studiile organitelor subcelulare cum ar fi mitocondriile, fiind foarte utilizat ca model de studiu în fiziologie, biofizică sau biochimie.

Pentru a studia acţiunea unui anumit medicament, primul pas îl reprezintă studiile *in vitro*, incubarea medicamentului în culturi celulare şi doar în momentul în care rezultatele sunt înţelese este posibil pasul doi care corespunde administrării medicamentului la animalele ce pot dezvolta boli asemănătoare oamenilor.

Studiile cu animalele de laborator (porci de guinea şi iepuri) au îmbunătăţit semnificativ nivelul de înţelegere al etiologiei şi patogenezei unor boli.

Un exemplu este cazul modelului animal folosit în studiul tuberculozei. Oamenii, bovinele, cerbii, porcii de guinea şi iepurii au patogeneză similară, dar diferă în sensibilitatea lor faţă de tuberculoză. Deşi studiile pe porcii de guinea şi iepuri au adus un aport important în înţelegerea virulenţei şi patogenezei tuberculozei, acestea au însă limite în cazul studierii răspunsului imun protectiv.

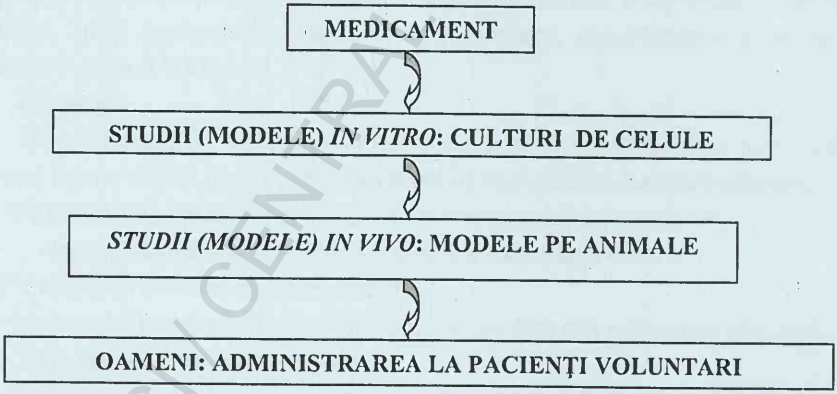

MEDICAMENT
STUDII (MODELE) *IN VITRO*: CULTURI DE CELULE
STUDII (MODELE) IN VIVO: MODELE PE ANIMALE
OAMENI: ADMINISTRAREA LA PACIENŢI VOLUNTARI

Figura III.9.1. Diagrama studiului unui nou medicament pentru âtratarea unei maladii

Încă din 1970, şoarecii au înlocuit porcii de guinea şi iepurii ca modele animale pentru studiul imunologiei infecţiilor cu *micobacterii*. Majoritatea studiilor cu privire la rolul macrofagelor şi monocitelor şi interacţiunea lor cu celulele T au fost efectuate la şoareci infectaţi intravenos cu BCG.

Un alt exemplu de model animal folosit in Biofizică este broasca. Pielea broaştei posedă un număr de proprietăţi similare celor găsite in epiteliile umane, cum ar fi mucoasa

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

tractului gastro-intestinal, tubulii renali etc. Epiteliul pielii de broască are ioni de absorbţie (Na^+) şi mecanisme de secreţie care pot fi găsite în aproape fiecare celulă a corpului uman. Modul prin care celulele umane absorb sodiul este un exemplu (a se vedea şi lucrarea practică

Transportul activ prin biomembrane).

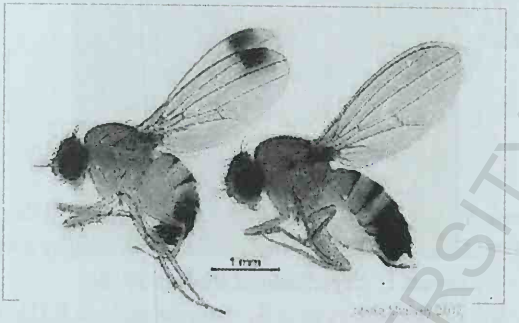


Figura III.9.2. Drosophila melanogaster sau musculiţa de oţet

Modelele animale joacă un rol esenţial în genetică, cum ar fi cel al unei insecte numite *Drosophila melanogaster*, sau musculiţa de oţet. În general, modelele insecte oferă multe avantaje, cum ar fi întreţinerea lor facilă, existenţa de linii genetice pure şi a mutanţilor bine-definiţi, durată scurtă de viaţă şi existenţa variabilităţii biologice imense. În particular, *Drosophila* oferă avantajele unei literaturi substanţiale detaliate despre caracteristicile genetice, biochimice, fiziologice şi comportamentale. Cu toate acestea, ca şi nevertebrată, *Drosophila* nu are întregul program genetic unic al vertebratelor.

În 1933 ***Thomas Hunt*** a primit premiul *Nobel* în *medicină sau fiziologie* pentru descoperiri privind rolul jucat de cromosomi în ereditate. El a realizat experimente de iradiere cu raza X a musculiţelor de oţet si a observat mutaţiile cromosomiale produse de acestea.

De notat că există şi studii recente pe aceste modele animale, *Drosophila melanogaster*. Astfel doi cercetători, ***Laura Palanker Musselman*** şi ***Ronald P. Kühnlein***, au publicat un review al literaturii de specialitate privind utilitatea acestui model în obezitate şi bolile metabolice. Există câteva avantaje care recomandă folosirea acestui model. În primul rând musculiţele prezintă sisteme, organe şi tesuturi analoage celor implicare în obezitate la specia umană. Apoi, în timpul expunerii la mese hipercalorice musculiţele de oţet dezvoltă obezitate şi complicaţii similare cu cele ale pacienţilor diabetici. Şi, nu în ultimul rând, se pare că majoritatea genelor şi a familiilor de gene implicate în producerea bolilor metabolice se conservă la cele două specii, muşte şi oameni.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

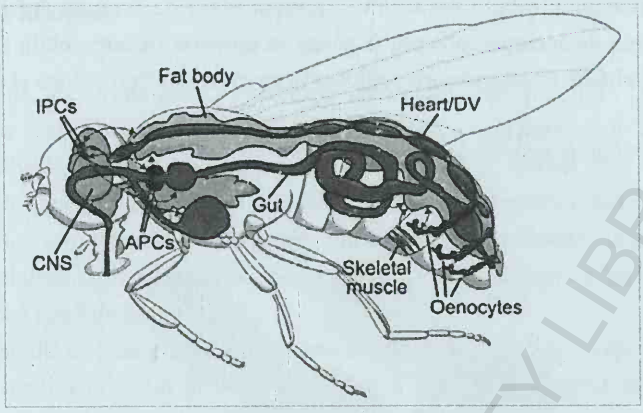


Figura III.9.1. Sistemele fiziologice de reglare a obezității la Drosophila (Laura Palanker Musselman, Ronald P. Kühnlein. Drosophila as a model to study obesity and metabolic disease. Journal of Experimental Biology 2018)

Un alt model este broasca africană: *Xenopus laevis*, cel mai folosit tip de amfibian în prezent. Avantajele acestui model animal pentru experimente sunt: robustețea și ușurința de creștere, faptul că este o vertebrată, accesibilitatea la materialul embrionic începând din primele stadii, cantitățile mari de ovocite și ouă. Dimensiunea relativ mare a oului și embrionilor facilitează manipularea fizică din stadiul de fertilizare. Aceste avantaje permit experimente embrionare care sunt dificile sau imposibile chiar de executat cu alte modele de organisme.

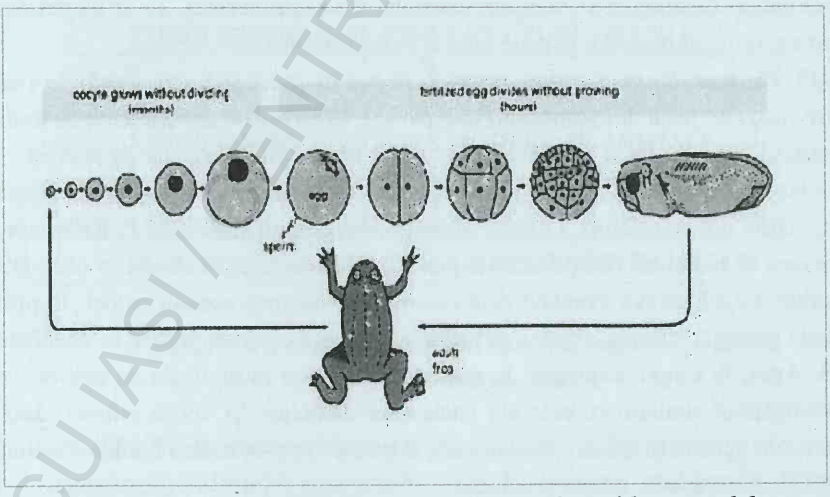


Figura III.9.3. Xenopus laevis, unul dintre cele mai bune modele pentru știință, datorită disponibilității în cantități mari de ovocite și ouă de dimensiuni mari și faptului că este o vertebrată – (136)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De fapt, expresia transgenelor nu este o proprietate particulară a şoarecilor, deoarece acum este posibilă stabilirea liniilor transgenice şi pentru *Xenopus laevis*.

Peştele Fugu (*Puffer Fish*) este folosit în studiul canalelor ionice (detalii în capitolul ***Biofizica transportului transmembrasnar***).

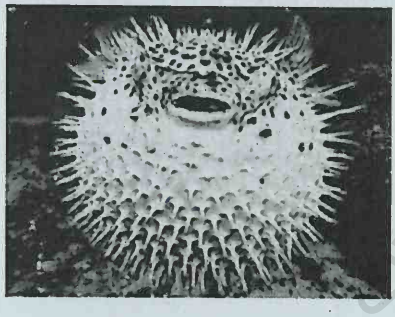


Figura III.9.4. Peştele Fugu, sursă de tetrodotoxină, antagonist al canalului de sodiu, care blochează influxul de sodiu – (137)

Pentru cel puţin 50 de ani, *şoarecele* a fost modelul animal clasic pentru studiile experimentale. Are avantajul de a fi un mamifer asemenea omului şi, de asemenea, genomul murin conservă idiosincraziile moleculare ale mamiferelor. Această relaţie genetică apropiată se regăseşte şi în multitudinea de proteine cu activităţi similare la cele două specii, făcându-le folositoare în experimentele biochimice şi biologice. Şoarecele a fost cel mai utilizat model din studiile genetice, şi este foarte de bine cunoscut din punct de vedere anatomic şi fiziologic. Aşadar ar fi un avantaj important dacă am avea o colecţie mare de şoareci mutanţi. Perioada îndelungată de utilizare experimentală a şoarecilor a dat naştere unui număr mare şi variabil de reactivi utilizaţi în studiul fenotipului şoarecilor mutanţi. Întrucât relaţiile dintre cele două genomuri de mamifere sunt bine cunoscute, progresul în secvenţierea şi înţelegerea structurii genomului uman poate facilita proiectele de cartografiere a genelor la şoarecii mutanţi. Se pare că şi secvenţializarea totală a genomului murin este destul de aproape.

Figura III.9.6. Modelul animal clasic pentru ştiinţa experimentală: şoarecele – (136)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O abordare a studiului unei funcții specifice ar putea fi eliminarea selectivă a genelor la șoareci, una câte una. Totuși, astfel de programe specifice de mutageneză, la scară mare, ar fi prea scumpe. În plus, embrionii șoarecilor cu malformații cardiace severe mor foarte repede, făcând dificilă analiza funcțională, chiar imposibilă (v. în completare si slide-urile de la curs).

În concluzie acesta este motivul pentru care în cercetarea biomedicală există multiple modele animale: musculița de oțet, peștii-zebră, meduza *Aequarea victoria*, broaștele *Xenopus*, soarecii, viermele *Caenorhabditis elegans* etc.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III.10. Nanotehnologie, nanobiofizică, nanomedicină

Ce este nanotehnologia?

Nanotehnologia este noua stiinţă care asigură accesul la lumea de cele mai mici dimensiuni, de ordinul nanometrului, care este a milionimea parte dintr-un milimetru. *Gândiţi-vă că diametrul firului de păr uman este de 50,000 mai mare! Nanotehnologia,* numită şi ingineria moleculară, reprezintă o ramură a ingineriei care se ocupă cu proiectarea şi fabricarea circuitelor electronice extrem de mici şi a dispozitivelor mecanice construite la nivelul molecular. *Institutul de Nanotehnologie* din Marea Britanie (*U.K)* defineşte *nanotehnologia* ca fiind: *"ştiinţa şi tehnologia unde dimensiunile şi limitele între 0,1 şi 100 nanometri (nm) joacă un rol critic".* Poate fi definită ca fiind ingineria sistemelor funcţionale la scară moleculară, acoperind astfel şi ceea ce se petrece în momentul de faţă în domeniul nanotehnologiei cât şi concepte mai avansate.

O scurtă istorie a nanotehnologiei

K. Eric Drexler a fost primul care s-a referit la *'nanotehnologie'* în anii 1980; vorbea de construirea de aparate la scară moleculară, motoare de câţiva nanometri, 'arme' robot, chiar şi calculatoare, mult mai mici în dimensiuni decât o celulă. *Drexler* a petrecut următorii 10 ani descriind şi analizând aceste incredibile dispozitive. Între timp, ştiinţa a dezvoltat abilitatea de a construi structuri simple la scară moleculară. O dată cu acceptarea conceptului, sensul cuvântului cuprinde şi cele mai simple tipuri de tehnologii la scară nanometrică. *U.S. National Nanotechnology Initiative* a fost creat pentru a finanţa acest tip de tehnologie: definirea lor include *orice este mai mic de 100 nm şi are proprietăţi noi.*

Nanotehnologia, în sensul tradiţional, înseamnă construirea lucrurilor de la scară macro la scară micro (cu susul în jos), cu precizie de nivel atomic. Această proprietate a fost imaginată în 1959 de către câştigătorul *Premiului Nobel* în *Fizică, Richard Feynman* care a spus: *„Vreau să construiesc un miliard de fabrici mici, modele ale fiecăreia, create simultan ... Principiile fizicii, în măsura în care ştiu, nu fac referire la imposibilitatea manevrării lucrurilor atom cu atom. Aceasta nu este o încercare de a încălca legile; este ceva, ce în principiu poate fi făcut; dar în practică nu a fost realizat pentru că suntem prea mari".*

Mihail (Mike) Roco de la *U.S. National Nanotechnology Initiative* a descris *patru generaţii* ale dezvoltării nanotehnologiei. Prima generaţie, nanostructuri pasive, materiale proiectate pentru a îndeplini o singură cerinţă. A doua etapă, introduce nanostructuri active multifuncţionale; de exemplu, dispozitive pentru transportul medicamentelor şi biosenzorii. A treia generaţie care a început în jurul anului 2010 cuprinde nanosisteme cu mii de componente care interacţionează. După câţiva ani, se aşteaptă dezvoltarea nanosistemelor integrate, care funcţionează ca o celulă umană cu sistemele ierarhice în cadrul sistemului de ansamblu.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În plus față de *biotehnologie*, *nanobiotehnologia* este una dintre cele mai orientate tehnologii spre viitor din secolul XXI. Nanobiotehnologia devine o știință interdisciplinară bazată pe o dezvoltare explozivă a inovațiilor. Ea face legătura între lumea vie și mașini și are ca sop dobândirea cunoașterii principiilor de bază ale sistemelor biologice funcționale, cât și construirea de structuri tehnice la scară nano într-un mod controlat.

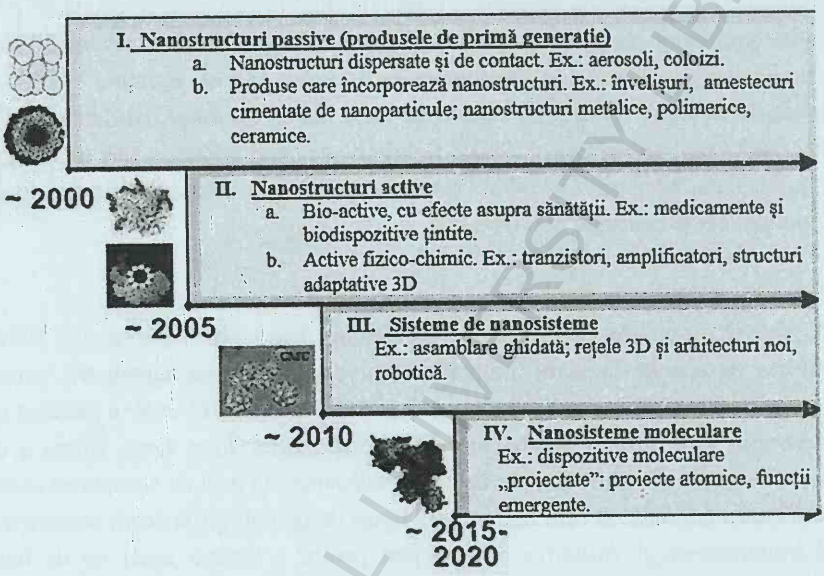

I. Nanostructuri passive (produsele de primă generație)
a. Nanostructuri dispersate și de contact. Ex.: aerosoli, coloizi.
b. Produse care încorporează nanostructuri. Ex.: învelișuri, amestecuri cimentate de nanoparticule; nanostructuri metalice, polimerice, ceramice.
~ 2000
II. Nanostructuri active
a. Bio-active, cu efecte asupra sănătății. Ex.: medicamente și biodispozitive țintite.
b. Active fizico-chimic. Ex.: tranzistori, amplificatori, structuri adaptative 3D
~ 2005
III. Sisteme de nanosisteme
Ex.: asamblare ghidată; rețele 3D și arhitecturi noi, robotică.
~ 2010
IV. Nanosisteme moleculare
Ex.: dispozitive moleculare „proiectate": proiecte atomice, funcții emergente.
~ 2015-2020

Figura III.10.1. Cele patru generații de nanosisteme – (134)

Ce este nanobiofizica?

Nanobiofizica se ocupă cu *studiul fenomenelor vii la scară nano*, însemnând, de exemplu, studiul fizic al sistemelor biologice, măsurători ale forțelor la nivelul unei singure molecule, ADN sau ARN (conformație și dinamică), 'mașini' și motoare moleculare, detectarea electronică a biomoleculelor prin efectul de tranzistor, trecerea moleculelor individuale prin nanopori (măsurători ale curentului și FRET).

De-a lungul ultimilor ani, stiința bionanomaterialelor a devenit un domeniu interesant, în care studiile teoretice și experimentale asupra structurii și funcției bionanomaterialelor au o importanță aparte, importanța ADN-ului, ARN-ului și peptidelor ca bionanomateriale în dezvoltarea fundamentală în biologie și nanomateriale a început să fie recunoscută. În particular, biochimia, biofizica, biomecanica, termodinamica și proprietățile electronice ale ADN-ului, ARN-ului și peptidelor, dar și ale materialelor biologice compozite inteligente, au devenit o nouă frontieră interdisciplinară în stiința materialelor. Există o nevoie tot mai mare pentru un studiu mai sistematic al aspectelor de bază implicate în bionanomateriale și o participare mai activă a cercetătorilor în domeniul de aplicare a acestor noi materialelor.

S-au realizat progrese în cazul materialelor pentru nanobiocipuri, materialelor biomimetice la scară nano, nanomotoarelor, nanocompozitelor, biomaterialelor de interfață, nanobiosenzorilor şi nanosistemelor de transport a medicamentelor, cu diverse aplicații în medicină.

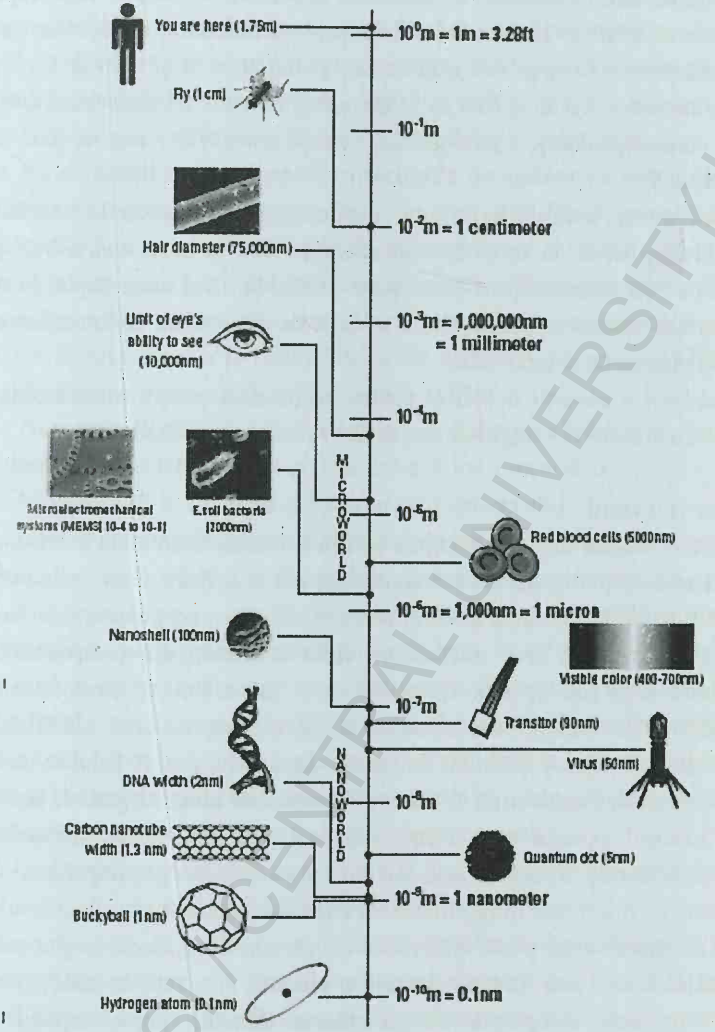


Figura III.10.2. Exemple de dimensiuni macro, micro- si nanometrice

Pentru ca să înţelegem mai bine ce înseamnă acest domeniu de *nano*, să luăm un exemplu. Astfel, o picătură de sânge poate conţine până la 5 milioane de eritrocite. Diametrul unei hematii este de 7,5 μm (7500 nm), cu o grosime de 2,5 μm (2500 nm), în timp ce un nanorobot poate avea un diametru de 1 nm.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ce este nanomedicina?

Nanomedicina este aplicaţia *nanotehnologiei* în vederea prevenirii şi tratamentului bolilor. Disciplina este încă la început. Are potenţialul de a schimba dramatic ştiinţa medicală a secolului XXI.

O altă nouă disciplină este în curs de dezvoltare în medicină: *medicina nanoscopică.* Bazându-se pe premisele că bolile se manifestă ca defecte ale proteinelor, s-a demonstrat că aceste proteine formează complexe specifice exercitându-şi funcţiile ca şi cum ar fi maşini nanoscopice. *Medicina nanoscopică se referă la vizualizarea directă, analiza (diagnoza) şi modificarea (terapia) nanomaşinilor proteice din celulele şi ţesuturile vii cu scopul de a îmbunătăţi sănătatea umană.*

Medicina nanoscopică este diferită de nanomedicină. Rădăcinile *medicinei nanoscopice* se trag din medicină, în timp ce *nanomedicina* are la bază *nanotehnologia. Medicina nanoscopică* doreşte îmbunătăţirea cunoaşterii celulei la nivel nanoscopic, în timp ce *nanomedicina* îşi doreşte crearea dispozitivelor artificiale de dimensiuni nanometrice cum ar fi nanoroboţii în scop diagnostic şi terapeutic.

Domeniul nanoscopiei a devenit accesibil pentru prima dată pentru microscopia de fluorescenţă mono-moleculară (SFM - *single-molecule fluorescence microscopy*).

Nanoroboţii: medicina viitorului

Un *nanorobot* este o maşină minusculă creată pentru a realiza o anumită activitate în mod repetat cu o precizie de câţiva nanometri. Nanoroboţii pot fi definiţi şi ca device-uri la scară nano care vor avea rolul de a proteja şi de a întreţine sănătatea corpului uman. Aceşti roboţi vor avea diametrul între 0,5 si 3 micrometri, fiind construiţi din componente cu dimensiuni cuprinse între 1 şi 100 de nm. Carbonul va fi materialul de bază folosit în construcţia lor, sub formă de fulereni sau nanotuburi de carbon, datorită soliditătii şi rezistenţei acestuia. Elemente uşoare precum oxigenul sau azotul pot fi folosite pentru îndeplinirea de funcţii speciale. Pentru a nu fi atacate de sistemul imun al gazdei, cea mai bună alegere pentru învelişul exterior este o structură pasivă asemănătoare diamantului. Astfel de roboţi au fost proiectaţi în ultimii ani, dar nu există încă un prototip funcţional. Principalul avantaj al nanoroboţilor este durabilitatea crescută (ani, decenii sau chiar secole).

Sursa de energie a nanoroboţilor poate fi obţinută din metabolismul local al glucozei şi oxigenului. Într-un mediu clinic o altă sursă de energie ar putea fi furnizată de unde acustice externe. Nanoroboţii vor avea computere ce îndeplinesc funcţii simple capabile de aproximativ 1000 de calcule pe secundă. Comunicarea din exterior cu aceşti roboţi se va realiza prin semnale acustice de tip radio.

O reţea de navigaţie poate fi realizată în corp cu staţii intermediare care vor menţine acurateţea poziţionării nanoroboţilor care trec prin dreptul lor, urmând să-i redirecţioneze unde este nevoie. Acest tip de coordonare este utilă medicului pentru distribuirea nanoroboţilor în funcţie de necesităţi. Nanoroboţii vor putea recunoaşte tipurile de celule întâlnite în funcţie de anticorpii de pe suprafaţa lor şi vor fi capabili de chemotaxie.

Când funcţia lor este îndeplinită ei pot fi recuperaţi, corpul îi va excreta pe căile normale de eliminare.

Domeniile de aplicare ale nanoroboților medicali

Enumerăm câteva aplicații posibile; în:

- **Dermatologie**, o cremă cu nanoroboți care poate înlătura celulele moarte, sebuumul excesiv, poate hidrata pielea sau poate curăța porii în profunzime.

- **O apă de gură cu nanoroboți** care poate identifica și distruge bacteriile cu potențial patogen, fără a afecta însă flora normală. De asemenea poate înlătura particulele alimentare și tartrul cu atât mai mult cu cât acești nanoroboți se vor afla într-o suspensie care le va permite accesul în spații altfel inaccesibile. Astfel de roboți pot fi construiți pentru a rezista doar câteva minute până să se dezintegreze în fibre de tipul celor alimentare.

- **Nanoroboții care pot spori capacitatea de apărare a sistemului** prin identificarea și neutralizarea bacteriilor. Când o bacterie este identificată, membrana ei poate fi lezată, perturbându-i astfel mecanismele de homeostazie, eventual fiind capabile chiar de a neutraliza conținutul potențial periculos al bacteriei. De asemenea pot fi utilizați și în lupta cu virușii. Un astfel de model a fost propus recent de cercetătorul japonez *Satoshi Uchida*, profesor de bioinginerie la Universitatea din Tokyo (v. interviul, *COVID-19: Nanomachines to be deployed to fight next viral pandemic*, - (131).

- **Nanoroboții din curentul sanguin** pot distruge plăcile de ateroscleroză și dilata vasele sanguine putând astfel preveni apariția infarctelor miocardice.

- **Nanoroboții în detecția și tratamentul cancerului**

Dezvoltarea nanoroboților poate duce la progrese remarcabile în detecția și tratamentul cancerului. Acești roboți vor fi capabili să recunoască diferitele tipuri de celule, inclusiv să facă distincția între o celulă cu fenotip malign și o celulă normală prin intermediul antigenelor de pe suprafața membranei celulare. Acest lucru se va realiza prin intermediul unor senzori chemotactici care sunt specifici pentru anumiți antigeni ai celulelor canceroase. O altă întrebuințare a nanoroboților ar putea fi pentru utilizarea acestora în susținerea apărării antitumorale. Spre exemplu acești nanoroboți pot detecta concentrațiile de E-caderină și beta–catenină în fazele inițiale sau metastatice tumorale, pentru a selecta celulele ce vor fi distruse. S-au luat în considerare următoarele metode de control:

- *aleatorii*: nanoroboții care se mișcă pasiv prin curentul sanguin, ajung întâmplător la ținta lor datorită mișcării browniene.
- *urmărind un gradient:* nanoroboții detectează concentrația de E-caderină și merg în sensul creșterii concentrației până ce își ating ținta. Dacă în 50 ms nu detectează un alt semnal ei vor considera prima măsurătoare ca fiind un fals pozitiv și își vor continua drumul pur și simplu prin fluxul sanguin.
- *printr-un gradient și un atractant:* pe lângă cele de mai sus, un nanorobot odată ajuns la țintă emite un semnal chimic care atrage și alți nanoroboți.

Un exemplu practic de abordare a nanoroboților pentru detecția și tratamenul cancerului

Pharmacyte-ul este un nanorobot medical controlat de calculator capabil de transportul ghidat al agenților farmaceutici la destinații celulare și intracelulare înăuntrul corpului uman. Pharmacytele scapă de procesul de fagocitare deoarece acestea nu vor emboliza vasele de sânge mici (diametrul minimul al capilarelor umane care permite trecerea intactă a

eritrocitelor şi a celulelor albe este de aproximativ 3-4 micrometri, fiind mai mare decât dimensiunea celui mai mare *Pharmacyte).*

Pharmacytul va putea avea multe aplicaţii în nanomedicină cum ar fi iniţierea apoptozei în celulele canceroase şi controlul direct al proceselor de semnalizare celulară. Pharmacyte ar putea, de asemenea marca celulele ţintă ale sistemelor de evacuare şi sistemele defensive naturale biochimice, o strategie numită „marcaj fagocitic". De exemplu, moleculele de recunoaştere noi sunt exprimate pe suprafaţa celulelor apoptotice. În cazul limfocitelor T, o astfel de moleculă este fosfatidilserina, un lipid care se găseşte în mod normal pe partea interioară a membranei plasmatice dar care după inducerea apoptozei, va apărea pe exterior.

Celulele care poartă aceste molecule pe suprafaţa lor pot apoi să fie recunoscute şi eliminate de către celulele fagocitare. Marcarea pe peretele exterior al unei celule ţintă cu fosfatidilserină sau alte molecule cu acţiune similară ar putea activa comportamentul de fagocitoză al macrofagelor, care identifică greşit celula ţintă ca fiiind ade tip poptotic, capabilă de declanşarea unei reacţii de către organism. Pharmacytul ar fi capabil să transporte aproape 1 metru cub de încărcătură farmaceutică depozitată în rezervoare descărcate mecanic folosind pompe moleculare de sortare care funcţionează sub controlul unui calculator.

În funcţie de cerinţe, încărcătura poate fi descărcată în lichidul extracelular proxim sau livrată direct în citosol folosind un mecanism transmembranar injector. În caz de nevoie, pentru o anumită aplicaţie, cili mecanici sau sisteme locomotoare, pot fi adăugate la *Pharmacyt* pentru a permite mobilitatea transvasculară şi transcelulară, permiţând astfel transportul moleculelor farmaceutice la adrese celulare şi intracelulare cu erori neglijabile. O dată epuizată încărcătura sau îndeplinită misiunea, *Pharmacytul* ar putea fi recuperat de la pacient pe căi excretorii convenţionale. Nanoroboţii ar putea fi atunci reîncărcaţi, reprogramaţi şi reciclaţi pentru utilizare la un al doilea pacient care ar putea avea nevoie un agent farmaceutic diferit ce urmează a fi direcţionat către ţesuturi sau celule diferite spre deosebire de primul pacient.

- Nanoroboţi în diagnosticul şi tratamentul diabetului

Glucoza transportată prin fluxul de sânge ajută la menţinerea unui metabolism uman la un nivel sănătos, iar nivelul corect din sânge este un factor important în diagnosticul şi tratamentul diabetului. Legată intrinsec de moleculele de glucoză, proteina hSGLT3 are o influenţă importantă în reglarea concentraţiei extracelulare de glucoză prin menţinerea stimulării colinergice gastrointestinale adecvate şi a activităţii muşchilor scheletici. Molecula hSGLT3 poate fi utilă în determinarea nivelelor de glucoză pentru pacienţii diabetici. Cel mai interesant aspect al acestei proteine este faptul că serveşte ca senzor de identificare al glucozei.

Modelul prototip al nanorobotului a încorporat semi-conductorul nanobioelectronic CMOS (*Complementary Metal Oxide semi-conductor*). Se prevede o dimensiune de ~2 micrometeri pentru acest prototip, care permite operarea liberă înăuntrul corpului. Indiferent dacă nanorobotul este sau nu vizibil pentru reacţiile imune, nu interferă în detectarea nivelelor de glucoză din fluxul sanguin. Chiar şi cu reacţie din partea sistemului imun, nanorobotul nu este atacat de celulele albe datorită biocompatibilităţii. Pentru monitorizarea

BUJ BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

glucozei nanorobotul foloseşte un chemosenzor încorporat care implică modularea activităţii proteinei hSGLT3.

Prin senzorul chimic, nanorobotul poate determina efectiv dacă pacientul are nevoie ca insulina să fie injectată, sau de orice altă acţiune, cum ar fi orice altă medicaţie prescrisă clinic. Imaginea simulatorului arată interiorul unui vas de sânge cu textura de reţea, celulele roşii şi nanoroboţii. Aceştia curg cu eritrocitele prin sânge detectând nivelele de glucoză. Nanoroboţii încearcă să pastreze nivelele de glucoză la valoarea medie de 130 mg/dl. O variaţie de 30 mg/dl a fost acceptată ca şi nivel de variaţie care să necesite intervenţia terapeutică, dar această valoare poate fi modificată. În arhitectura nanorobotului medical, datele importante măsurate pot fi apoi transferate automat prin semnale radio telefonului mobil purtat de pacient. Dacă glucoza atinge nivele critice, nonorobotul va emite o alarmă prin telefonul mobil.

Controlarea nivelului de glucoză folosind nanoroboţi

În simulare, nanorobotul este programat, de asemenea, să emită un semnal la orele pentru masă, apoi va măsura valorile glicemiei la intervalele de timp dorite. Nanorobotul poate fi programat pentru a activa senzorii şi măsura regulat nivelul glicemiei dimineaţa devreme, înaintea micului dejun. Nivelele sunt măsurate la fiecare 2 ore după prânzul planificat. Aceleaşi proceduri pot fi programate pentru alte mese din timpul zilei. Multitudinea de roboţi va permite măsurători în diverse locuri, permiţând astfel medicului să evalueze glicemia în tot organismul.

Examinarea unor serii de date din mai multe locaţii permite măsurători precise ale vitezei de schimbare a concentraţiei de glucoză din sânge care trece prin anumite organe, ţesuturi, capilare şi vase specifice. Aceasta va avea o utilizare în detectarea vitezei anormale de asimilare a glucozei care poate folosi în determinarea ţesuturilor care au suferit din cauza diabetului: deteriorările asociate, şi în ce măsură. Se pot folosi şi alţi senzori care pot preciza observaţii relevante pentru diagnostic, cum ar fi presiunea sanguină a pacientului, semne timpurii ale gangrenei sau schimbări în metabolismul local care poate fi asociat cu un cancer în stadiu incipient. Seriile de date din tot corpul colectate în timpul diverselor niveluri de activităţi (de exemplu, de odihnă, de sport, postprandial, etc.) ar putea avea o valoare suplimentară de diagnosticare în cursul evaluării şi extensiei bolii.

Aceste date importante pot ajuta medicii şi specialiştii în supravegherea şi îmbunătăţirea meticamentaţiei pacientului precum şi a dietei zilnice. Procesul de folosire a nanoroboţilor poate fi mai convenient şi eficace pentru confecţionarea unui sistem automat fezabil pentru colectarea datelor şi monitorizarea pacientului. De asemenea, ar putea fi posibilă evitarea eventualelor infecţii datorate injectărilor zilnice necesare preluării probelor de sânge, posibilele pierderi de date, şi se poate chiar evita omiterea unor prelevări de probe de glucoză într-o săptămână ocupată. Aceste descoperiri recente în nanobioelectronică ilustrează cum se integrează dispozitivele de sistem şi telefoanele mobile pentru a realiza un control mai bun a glicemiei la pacienţii cu diabet.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Respirocitul – un nanorobot artificial purtător de oxigen

Respirocitele sunt nanomaşini, nanoroboţi imaginari, mici dispozitive mecanice proiectate să opereze la nivel molecular. Fiecare respirocit are între 0,2 şi 2 microni în diametru. Respirocitele îndeplinesc funcţia celulelor roşii, aceea de purtători de oxigen şi molecule de dioxid de carbon prin corp. Aceaste celule roşii artificiale plutesc prin sânge. Sunt alcătuite în mare parte din atomi de carbon aranjaţi ca diamantul într-o stuctură matriceală poroasă înăuntrul carcasei sferice.

Respirocitul este, în esenţă un rezervor de presiune mică care poate fi pompat cu molecule de oxigen (O_2) şi dioxid de carbon (CO_2). Aceste gaze pot fi eliberate din rezervor într-o manieră controlată. Gazele pot fi stocate până la presiuni de 1000 de atmosfere. Respirocitele pot fi complet non imflamabile datorită dispozitivul intern din safir, un material ignifug cu proprietăţi similare diamantului.

Figura III.10.3. Modelul exterior al respirocitului – (134)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

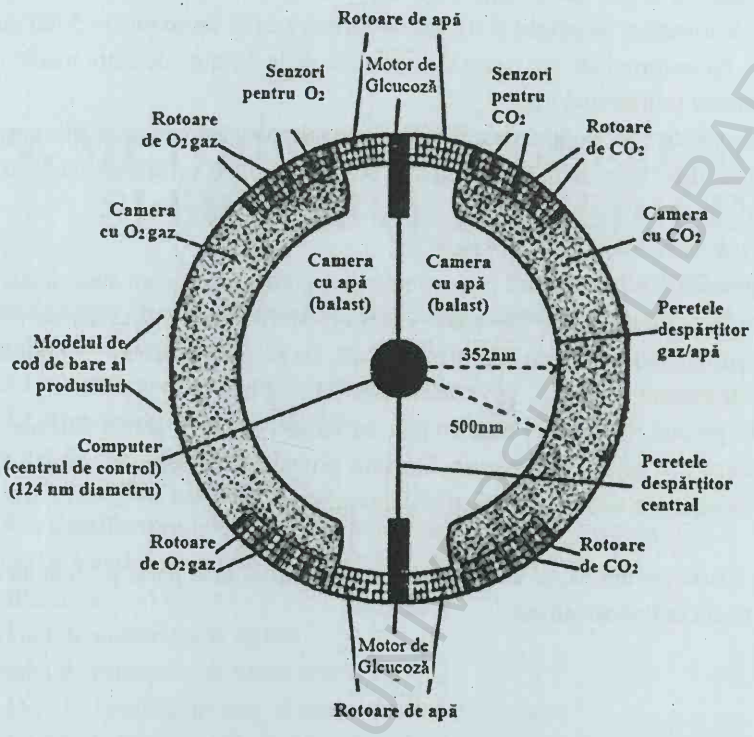


Figura III.10.4. Secţiune printr-un respirocit. *Rotoare de dioxid de carbon: pompează dioxidul de carbon din sau în celulă. Motorul bazat pe glucoză dă energia necesară pompelor. Rotorul de apă propulsează respirocitul. Camera pentru dioxid de carbon colectează dioxidul de carbon. Rotoare de oxigen scot sau introduc oxigen în respirocit. Centrul de control monitorizează presiunile gazelor şi comandă pompele. Camera de oxigen colectează oxigenul până la eliberare. – (135)*

Există, de asemenea, senzori cu concentraţie de gaz pe partea externă a fiecărui dispozitiv. Atunci când nanorobotul trece prin capilarele plămânului, presiunea parţială de O_2 este ridicată, iar presiunea parţială a CO_2 este scăzută, astfel încât calculatorul conectat direcţionează rotorii de sortare să încarce rezervoarele cu oxigen şi să elimine CO_2

Atunci când dispozitivul se află într-un ţesut periferic schimbul de gaze se va produce invers. Adică, presiunea parţială de CO_2 este relativ mare şi cea de O_2 relativ mică, aşa încât calculatorul comandă rotorilor de sortare să elibereze O_2 şi să absoarbă CO_2. Respirocitul imită astfel funcţia hemoglobinei naturale din eritrocite. Respirocitele pot livra oxigen de 236 de ori mai mult pe unitatea de volum decât o celulă roşie naturală.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Injectarea a 5 cm^3 de soluție care conține 50 % respirocite poate înlocui întreaga capacitate de transport de oxigen și dioxid de carbon a celor aproximativ 5400 ml de sânge ai pacientului. Și respirocitele vor putea fi controlate de la distanță de către medic prin semnale acustice externe (ultrasound like).

Respirocitele pot astfel înlocui parțial sângele pierdut în cazuri de urgență sau pot elibera oxigen doar în cazul în care pacientul nu are acces la o sursă externă de oxigen.

Pe scurt, cum funcționează respirocitele?

Respirocitele schimbă gaze prin intermediul pompelor cu care sunt dotate și care sunt speciale pentru fiecare tip de moleculă. Fiecare respirocit are trei tipuri de pompe: pentru oxigen, pentru dioxid de carbon și pentru glucoză. De asemenea fiecare respirocit este dotat și cu camere de stocare a gazelor.

Odată produs respirocitul este umplut cu oxigen și pot fi direct folosite în cazuri de urgență pentru a fi injectate în sânge. Ele sunt propulsate de torentul sanguin și eliberează oxigenul, culegând în același timp dioxidul de carbon.

Este foarte posibil ca, în viitor, acești nanoroboți să facă parte și chiar să contribuie la progresul medicinii personalizate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV. METODE ŞI TEHNICI FIZICE ŞI BIOFIZICE ÎN MEDICINĂ

IV.1. Metode generale şi instrumentale: clasificare, caracteristici generale
IV.2. Tehnici cromatografice
IV.3.1. Clasificare în relaţie cu principiul metodei
IV.3.2. Cromatografia de afinitate
IV.3. Tehnici de centrifugare
IV.4.1. Principiul metodei
IV.4.2. Clasificarea tehnicilor de centrifugare
IV.4. Etape în fracţionarea unui eşantion subcelular
IV.5. Liofilizarea
IV.6. Tehnici de microscopie optică
IV.7. Tehnici de microscopie electronică
IV.7.1. Prinicipiul fizic al microscopiei electronice
IV.7.2. Interacţiunea unui fascicul de electroni cu preparatul
IV.7.3. Componentele principale ale microscopului electronic
IV.7.4. Microscopia electronică de transmisie
IV.7.5. Microscopia electronică cu baleiaj
IV.7.6. Tehnici în relaţie cu microscopia electronică
IV.8. Difracţia cu raze X
IV.9. Tehnici de spectroscopie
IV.11.1. Principiu fizic şi clasificarea tehnicilor spectroscopice
IV.11.2. Spectre de tranziţie electronica
IV.11.3. Spectrometria de microunde (spectre de rotaţie)
IV.11.4. Spectrometria în infraroşu şi Raman (spectre de vibraţie - rotaţie)

N.B. Noţiunile din acest capitol trebuie completate cu noţiunile cuprinse în cartea de *Lucrări practice şi demonstraţii de Biofizică şi Fizică medicală*, 2003, V.Rusu şi colab. şi cu *slide-urile de la curs*.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.1. Metode generale şi instrumentale: clasificare, caracteristici generale

Pentru a delimita o ştiinţă trebuie îndeplinite două condiţii esenţiale: definirea obiectului de studiu şi cunoaşterea *metodelor specifice* de studiu. Există, însă, şi metode de studiu care pot fi utilizate pentru toate domeniile ştiinţei, numite *metode generale* de studiu.

Ca urmare, în biofizică, metodele de studiu pot fi clasificate în:

- **Metode generale**
- **Metode instrumentale (specifice *Biofizicii*)**

- **Metode generale**

Există două tipuri de metode generale: *observaţia ştiinţifică* şi *experimentul*. Acestea au o serie de caracteristici prezentate, comparativ în tabelul următor:

	OBSERVAŢIA (ŞTIINŢIFICĂ) caracteristici:	**EXPERIMENTUL caracteristici:**
comune	- intentională - metodică - organizată (sistematizată) - valoare cognitivă - depinde de calităţile cercetătorului	- intentional - metodic - organizat (sistematizat) - valoare cognitivă - depinde de calităţile cercetătorului
diferite	- fără intervenţia cercetătorului	- cu intervenţia cercetătorului
specifice	- poate fi: 1. directă (bazată pe percepţia observatorului) 2. indirectă (mediată de un instrument*)	- poate fi: 1. *in vivo* (pe model animal) 2. *in vitro* (pe celule, ţesuturi, structuri tisulare izolate, culturi de cellule) - NU poate fi, de regulă, aplicat pe om

*Primul instrument utilizat pentru a media observaţia clinică a fost *stetoscopul*, introdus de ***René Laennec.*** De atunci s-au dezvoltat şi alte dispozitive pentru medierea observaţiei, de exemplu în *oftalmologie* sau *otorinolaringologie*).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **Metode specifice**

Metodele specifice domeniului *Biofizicii* se pot clasifica după trei criterii:

A. În relaţie cu principiul fizic al metodei
B. În relaţie cu modul de utilizare al metodei
C. În relaţie cu complexitatea biosistemului de studiat prin metodă.

A. În relaţie cu principiul fizic al metodei, principalele grupe de metode pot fi considerate, în scop didactic:

- Metode electrokinetice: electroforeza şi imunoelectroforeza – *curs şi LP*
- Metode cromatografice
- Metode de centrifugare - *curs şi LP*
- Metode optice – *curs şi LP*
- Difracţia cu raze X
- Microscopie optică – *curs şi LP*
- Microscopie electronică şi tehnicile înrudite
- Metode spectroscopice – *curs şi LP*

Pornind de la principiul fizic al metodei de bază, continuă să se dezvolte numeroase alte metode noi, unele derivate dintr-o singură grupă de metode, altele cu un caracter hibrid, combinând principii fizice din mai multe grupe de metode. Mai multe *premii Nobel* au fost acordate şi continuă să se acorde, în decursul timpului, pentru astfel de metode. Unele dintre ele vor fi amintite la curs sau le puteti alege drept subiect de studiu pentru un proiect. Toate acestea demonstrează că *Biofizica* este un domeniu în continuă schimbare, la interfaţa cu alte domenii fundamentale şi aplicative medicale şi că *evoluţia Medicinii depinde esenţial de evoluţia tehnicilor de studiu utilizate.*

B. În relaţie cu modul lor de utilizare, metodele se pot grupa în:

a. Metode de separare *(cele mai importante, pentru domeniul medical, fiind primele trei grupe de metode din enumerarea anterioară)*
b. Metode de analiză (*toate celelalte grupe de metode).*

C. În relaţie cu complexitatea biosistemului de studiat, metodele pot fi aplicate la nivel:

- atomic
- subcelular şi celular
- la nivelul sistemelor biologice complexe (ţesut, organ, corp întreg).

O parte dintre metodele specifice vor fi prezentate, succinct, în acest capitol. Unele dintre ele sunt studiate şi la lucrările practice şi demonstrative, toate fiindu-vă necesare pentru examen şi pentru înţelegerea utilităţii lor diagnostice şi/sau terapeutice, sau teranostice. Înţelegerea principiului fizic al unei metode utilizate în diagnosticul pacientului dă posibilitatea înţelegerii indicaţiilor şi contraindicaţiilor, rezultatelor fals positive sau fals negative, interpretării personalizate a rezultatelor, toate pentru un

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

diagnostic cât mai efficient și pentru un prognostic cât mai bun al bolii, deziderate care definesc, în prezent, conceptul de *medicină a preciziei*.

Atunci când studiați o metodă trebuie să urmăriți și să vă asigurați că ați reținut o serie de elemente:

- *Denumirea metodei:* poate fi istorică (de exemplu – *cromatografia*, a se vedea capitolul) sau în relație cu principiul fizic al metodei. In această a doua categorie intră, de exemplu, denumirea *electroforeză* care ar sugera, conform etimologiei (*foreză* vine din greaca veche, φορέω – a purta), *deplasare sub acțiunea unui câmp electric*, ceea ce se poate observa că ar corespunde, într-adevăr, principiului fizic al electroforezei, care este o *metodă de separare prin deplasarea particulelor încărcate electric în câmp electric*, sub acțiunea forței electrice. Deci simpla reținere logică a denumirii poate fi suficientă pentru a vă aminti principiul fizic al metodei ...

- *Principiul fizic al metodei:* care include, de obicei, o lege fizică (trebuie să rețineți și să înțelegeți ecuația matematică a legii și semnificația parametrilor din ecuație) și, posibil, o schema logică, elocventă pentru principiul fizic al metodei.

- *Utilitatea metodei pentru domeniul biomedical* - este esențial pentru un viitor medic să rețină și să înțeleagă când și unde poate fi utilă metoda studiată pentru medicină. Acest lucru nu va fi dificil dacă ați înțeles principiul fizic al metodei (de exemplu, electroforeza poate fi utilizată doar în separarea particulelor încărcate electric, cum sunt proteinele – deci în studiul metabolismului proteic - dar nu și pentru alte tipuri de molecule din organism, cum ar fi glucidele sau lipidele).

În relație cu principiul fizic al metodei, caracteristicile constructive esențiale ale aparatului utilizat pentru metoda respectivă vă pot ajuta să înțelegeți posibilele *surse de eroare* care pot influența rezultatele pacientului, lucru esențial pentru un medic care citește și interpretează rezultatele unei analize și trebuie să excludă posibile rezultate fals pozitive, de exemplu. Din acest punct de vedere, lucrul cu unele aparate ale căror părți componente sunt *'la vedere'* este un avantaj pentru reținerea logică a principiului metodei, comparativ cu utilizarea dispozitivelor moderne, automate, la care caracteristicile constructive nu sunt accesibile vederii.

Toate acestea vor fi ușor de înțeles și de reținut pentru întreaga profesie dacă studiul acestor metode nu va fi bazat pe memorizare ci pe raționament, ceea ce vă va ajuta și la dezvoltarea gândirii logice ca viitori medici, pregătindu-vă pentru diagnosticul complex al bolii care trebuie să țină cont de particularitățile pacientului, conform afirmației - veche de 2300 de ani, dar mereu de actualitate - ***„nu există boli, ci bolnavi"*** (*Hipocrate*).

UMF IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.2. Tehnici cromatografice

IV.2.1. Clasificare în relație cu principiul metodei
IV.2.2. Cromatografia de afinitate

IV.2.1. Clasificare în relație cu principiul metodei

Tehnicile cromatografice sunt metode de separare, utilizate în domeniul medical și farmaceutic, care permit izolarea unui compus dintr-un amestec, fie:

- în cantități mari (grame)
- în cantități mici - metode de purificare (picograme sau mai puțin), esențiale în practica și cercetarea medico-farmaceutică.

În principiu, orice sistem cromatografic constă din **două** faze:

I – **faza staționară** (solid, lichid, amestec solid – lichid)
II – **faza mobilă** (lichid, gaz), care curge prin faza staționară.

Cromatografia presupune un amestec de separat introdus într-o *fază mobilă* (gaz sau lichid). Faza mobilă este trecută, apoi, printr-o *fază staționară*, imobilă și nemiscibilă, care se găsește, adesea, într-o coloană.

Cele două faze sunt astfel alese încât compușii amestecului să aibă solubilități sau afinități diferite între cele două faze. Un compus din amestec care este destul de solubil în faza staționară va fi reținut mai mult și, ca urmare, va dura mai mult timp să treacă prin aceasta comparativ cu un compus care nu este foarte solubil/are afinitate mai mică în faza staționară, dar este foarte solubil/are afinitate mai mare în faza mobilă. Ca urmare a acestor diferențe de mobilitate, componentele eșantionului vor fi separate una de alta în timp ce se deplasează prin faza staționară.

Proba este transportată prin coloană, de obicei prin adăugarea continuă a fazei mobile. Acest proces se numește *eluție*. Viteza medie la care un compus (analit) se deplasează prin coloană este în relație cu timpul petrecut în faza mobilă.

Se poate defini un *coeficient de partiție sau de distribuție* (P_c), pentru a descrie modul în care un anumit compus se va distribui între aceste două faze, ca fiind raportul dintre concentrația molară a analitului în faza staționară (I) și concentrația molară a analitului în faza mobilă (II):

$$P_c = c_1/c_2$$

(unde : c_1 = concentrația în I; c_2 = concentrația în II)

P_c este constant, la o anumită temperatură.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

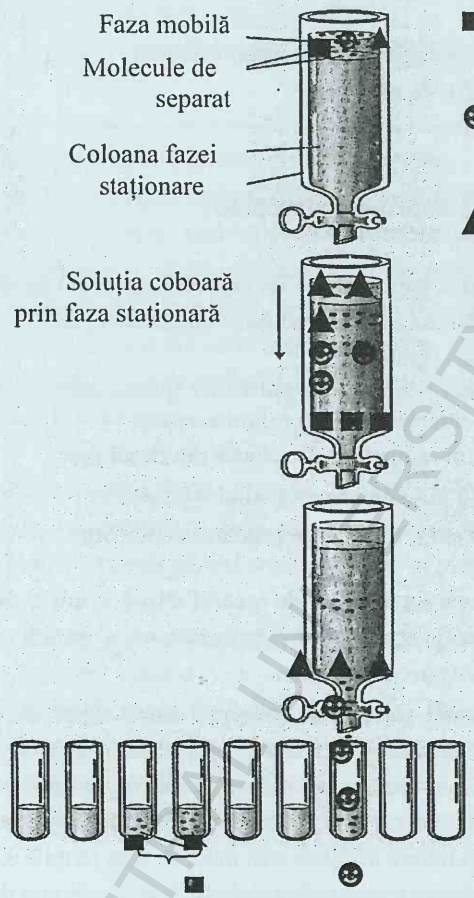

Faza mobilă
Molecule de separat
Coloana fazei staționare
Soluția coboară prin faza staționară
Particule mici reținute pentru faza staționară
Particule medii reținute pentru faza staționară
Particule mari reținute pentru faza staționară
Moleculele cu afinitatea cea mai scăzută pentru faza staționară apar primele

***Figura IV.2.1.2. Principiul tehnicii cromatografice** (107, modificat)*

Legat de mecanismul prin care faza staționară realizează imobilizarea particulelor din amestec, *există o serie de tipuri de cromatografie*, cele mai importante fiind:

- cromatografie de adsorbție
- cromatografia de schimb ionic
- cromatografie de permeație
- cromatografie de afinitate

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unul dintre cele mai importante tipuri de cromatografie pentru domeniul medical este *cromatografia de afinitate pe care o vom prezenta în continuare.* O altă metodă cu aplicabilitate certă este *cromatografia de schimb ionic*, pe care o veți găsi prezentată, ca aplicație pentru eluția *Generatorului de Molibden-Technețiu*, în *Fascicula II* (precum si pe *slide-urile de la curs*).

IV.2.2. Cromatografia de afinitate

Scopul cromatografiei de afinitate este de a separa dintr-un amestec cum ar fi serul sanguin toate moleculele cu afinitate moleculară specifică pentru o altă moleculă aflată în starea staționară. De exemplu, dintre anticorpii dintr-o probă de ser, cel care este specific pentru un anumit antigen, existent în faza staționară a coloanei de cromatografie , va putea fi izolați prin utilizarea cromatografiei de afinitate.

Principiul cromatografiei de afinitate poate include câteva etape:

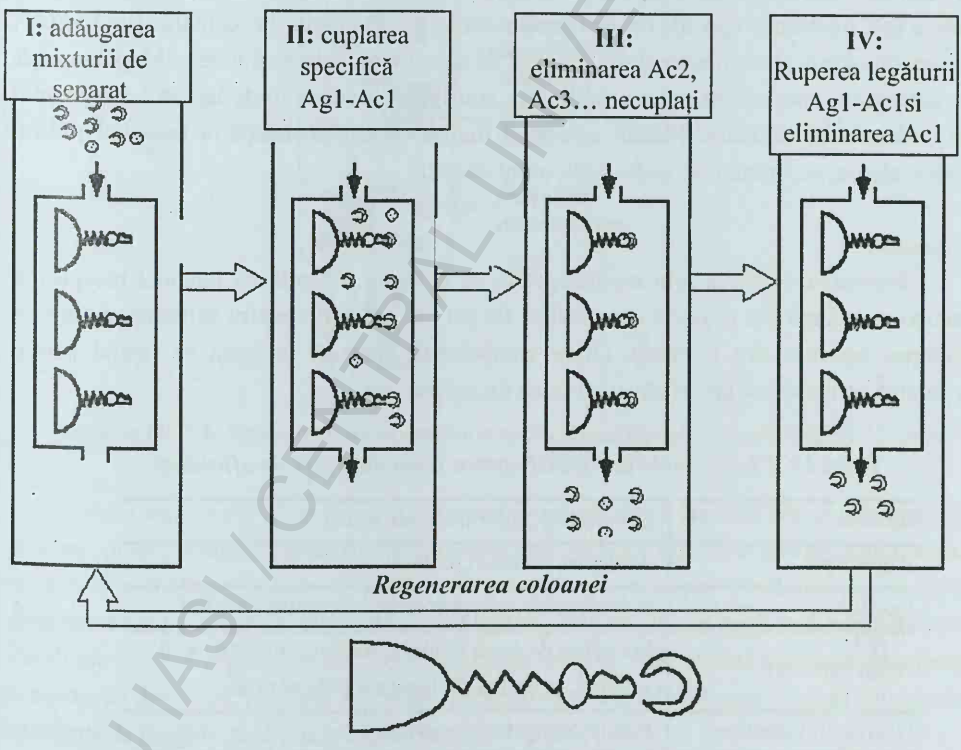

I: adăugarea mixturii de separat
II: cuplarea specifică Ag1-Ac1
III: eliminarea Ac2, Ac3... necuplați
IV: Ruperea legăturii Ag1-Ac1si eliminarea Ac1
Regenerarea coloanei
matrice separator ligand particulă

***Figura IV.2. 2.1. Etapele principiului cromatografiei de afinitate** (120, modificat)*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Inițial se prepară faza staționară. Aceasta constă dintr-o matrice solidă la care un antigen specific (îl vom numi Ag1) a fost cuplat (de obicei, covalent). Agaroza, sefadexul, derivații celulozei sau alți polimeri pot fi utilizați ca matrice.

Etapa I: Amestecul de anticorpi (Ac) care urmează să fie separat (serul) este aplicat la partea superioară a coloanei și va trece prin faza staționară.

Etapa II: Doar proteina (adică anticorpul pe care dorim să îl separăm, Ac1) care va corespunde specific cu Ag1 cuplat în faza staționară va realiza, împreună cu acest antigen, complexul Ag1 – Ac1 și va fi reținut în coloană.

Etapa III: Toți ceilalți Ac (Ac2, Ac3...) care nu corespund acestui Ag1 vor fi eliminați imediat din coloană.

Etapa IV: În această etapă, un eluent este trecut prin coloană pentru a elibera anticorpii reținuți aici, pe faza staționară. O soluție tampon cu un pH scăzut poate fi folosită pentru a rupe interacțiunile noncovalente stabilite în prima fază între anticorpul (Ac1) și antigenul specific (Ag1). De exemplu, o soluție cu un pH acid (3) va trece prin această coloană și aceasta va perturba complexul Ag1-Ac1 format initial, astfel încât Ac1 care a fost imobilizat specific de Ag1 va fi acum eliminat singur din coloană, fiind separat de ceilalți compuși ai amestecului. Un agent de denaturare, cum ar fi ureea 8M, poate rupe, de asemenea, interacțiunea prin modificarea configurației situsului de legare a antigenului de molecula de anticorp. Eluatul este apoi dializat pentru a îndepărta reactivul utilizat pentru eluare, separându-se, astfel, anticorpul căutat.

Ligandul

Separarea eficientă prin cromatografie de afinitate necesită ca ligandul biospecific (anticorp, enzimă sau proteină receptor) să fie cât mai specific pentru substanța de interes (antigen, substrat sau hormon). Orice componentă poate fi utilizată ca ligand pentru separarea prin cuplare specifică cu proteina de separat.

Tabel IV.2.1. Exemple de liganzi pentru cromatografia de afinitate:

Enzime	Substraturi, inhibitori, cofactori
Anticorpi	Antigeni, virusuri, celule
Lectine	Polizaharide, glicoproteine, receptori celulari
Acizi nucleici	Secvențe de bază complementare, histone, acid nucleic, proteină de legare a polimerazei
Hormoni, vitamine	Receptori, proteine cărăuș

Selecția ligandului pentru cromatografia de afinitate este influențată de doi factori. *În primul rând,* ligandul trebuie să prezinte afinitate de legare specifică și reversibilă pentru substanța care urmează să fie purificată. *În al doilea rând*, trebuie să aibă grupuri modificabile chimic, care să permită atașarea sa la matrice fără a distruge activitatea sa de legare. Ligandul ar trebui să aibă în mod ideal o afinitate pentru substanța de legare în intervalul 10^{-4} până la 10^{-8} M în soluție liberă. Interacțiunile care implică constante de

disociere mai mari de 10^{-4}, de exemplu reacția de legare între o enzimă și un inhibitor slab, sunt susceptibile de a fi prea slabe pentru succesul cromatografiei de afinitate. În mod invers, dacă constanta de disociere este mai mică decât aproximativ 10^{-8} M, de exemplu afinitatea dintre un hormon și receptorul său, eluarea substanței legate fără inactivare este posibil să fie dificilă.

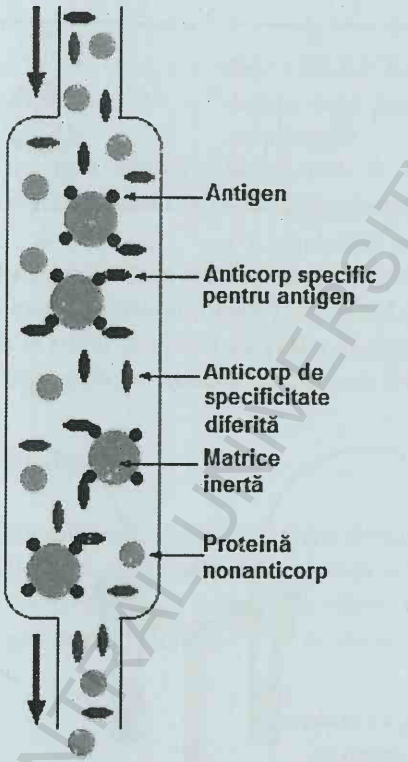


***Figura IV.2.3. Separarea unui anticorp prin cromatografie de afinitate** (118, modif)*

Faza staționară (Matricea): Sepharose este o structură formată din gel de agaroză care are practic toate caracteristicile necesare unei matrici eficiente pentru imobilizarea moleculelor biologic active. Grupările hidroxil de pe resturile glucidice pot fi ușor modificate pentru atașarea covalentă a unui ligand. Adsorbanții pe bază de *Sepharose* sunt stabili într-o gamă largă de condiții experimentale, cum ar fi pH ridicat și scăzut, detergenți și agenți de disociere, prezintă adsorbție nespecifică extrem de scăzută, asigură proprietăți excelente de curgere și obținere a unor separări rapide.

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

IV.3. Tehnici de centrifugare

IV.3.1. Principiul metodei

IV.3.2. Clasificarea tehnicilor de centrifugare

IV.4.1. Principiul metodei

Centrifugarea este o *metodă de separare* care oferă posibilitatea separării compuşilor de mărimi sau densităţi diferite dintr-un amestec, folosind un *câmp de centrifugare.*

În medicină, centrifugarea este utilizată pentru a separa (şi ulterior analiza) celule, organite şi macromolecule biologice, virusuri, proteine, izotopi ai unor metalele grele sau chiar şi ADN, dintr-o soluţie, în relaţie cu mărimea, forma şi densitatea acestora, dar, de asemenea, şi cu densitatea şi viscozitatea mediului, şi rotaţia aparatului numit *centrifugă.*

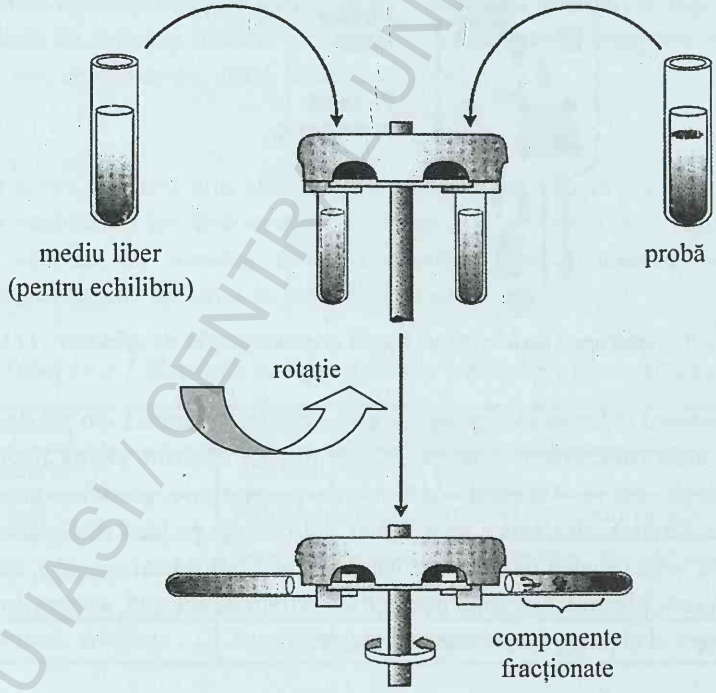


Figura IV.3.1.1. Prezentare diagramatică a centrifugării (107)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru a înţelege principiul acestei metode trebuie să pornim de la teoria unui proces obişnuit, cunoscut, *sedimentarea*, uşor de observat dacă, de exemplu, o probă de sânge este lăsată într-o eprubetă pentru o perioadă de timp: elementele figurate vor *sedimenta* sub influenţa *gravitaţiei*. În realitate două forţe opuse ca sens vor acţiona asupra particulelor din eprubetă: *greutatea (G)* şi *forţa de frecare (F)*.

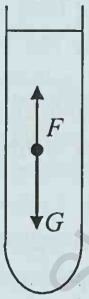
$G = mg$

şi

$F = 6\pi\eta rv$

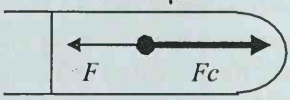
Fig. IV.3.1.2 Forţele care acţionează asupra unei particule în procesul de sedimentare
(unde :
m = masa particulei,
g = acceleraţia gravitaţională,
r = raza particulei,
η = viscozitatea mediului de separare,
v = viteza particulei în mişcare)

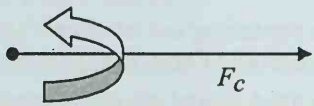
Particula se va deplasa sub rezultanta acestor forţe; presupunând că $G>F$, particula va sedimenta invers proporţional cu forţa de frecare F: viteza sedimentării va fi mai mare dacă lichidul în care are loc sedimentarea va fi mai putin viscos, viscozitatea fiind în acest exemplu unicul parametru modificabil în formula forţei de frecare.



Eprubeta cu proba

Eprubeta cu proba în rotaţie





Forţa centrifugă

Fig.IV.3.1.3. Forţa de centrifugare: rotaţia poate modifica G în mod artificial

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este evident că dacă particulele vor fi mai grele (*masă m - mai mare, G - mai mare*), ele vor sedimenta mai repede şi procesul va dura mai puţin Având în vedere că elementele subcelulare au masă foarte mică, separarea acestora doar sub acţiunea *G* ar dura mult prea mult. Pornind de la această problemă, s-a încercat să se găsească o posibilitate de a *'creşte artificial' G*. În mod normal acest lucru nu este posibil, dar dacă ne gândim că această forţă, *G*, reprezintă de fapt, după cum se vede în figura de mai sus, *o forţă care acţionează în sens opus frecării, pe direcţia separării, în axul eprubetei,* putem trage concluzia că acest lucru ar fi posibil prin rotaţie, respectiv cu ajutorul *forţei centrifuge*. Într-adevăr, dacă eprubeta cu amestecul de separat va fi rotită în jurul unui ax, o *forţă de centrifugare,* F_C, va acţiona asupra respectivei particule de masa *m,* fiind orientate, ca şi *G,* tot în axul eprubetei (aflată la distanţa *R* de ax).

$$F_c = m\omega^2 R = (\rho - \rho') \times V\omega^2 R$$

(unde: $\omega = 2\pi\nu$, viteza de rotaţie a particulei, R=raza, ν = frecvenţa de rotaţie, ρ şi ρ' = densităţile particulelor şi solventului, V=volumul particulei)

Dacă vom compara această forţă F_C cu forţa *G*, putem afla cu cât va fi mai mare această forţă de centrifugare faţă G, cât de "eficientă" va fi această forţă pentru a "sedimenta" mai rapid particula *m*. Această relaţie este definită ca fiind *factorul de eficienţă, I* (raportul dintre cele două forţe):

$$I = \frac{Fc}{G} = \frac{m\omega^2 R}{mg} = \frac{(2\pi\nu)^2 R}{g}$$

Se spune de obicei că factorul de eficienţă este *un număr de g* (*g* fiind o constantă, nu se mai face calculul propriu-zis). De exemplu, o centrifugă poate roti eprubete cu amestecuri de macromolecule cu până la 80 000 rpm *(rotaţii pe minut)*, generând forţe de 100 000 de ori mai mari decât forţa de gravitaţie. Aceasta este o caracteristică a fiecărei centrifuge, în parte, fiind raportată la distanţa dintre ax şi suportul pentru eprubete (raza *R*) şi frecvenţa de rotaţie, ν (sau numărul de rotaţii pe unitate de timp).

Practic, putem spune că centrifugarea separă amestecuri şi soluţii compactând partea solidă a acestora la baza unei eprubete de centrifugare, în timp ce partea lichidă rămâne deasupra. Lichidul rămas se numeşte *supernatant* iar partea solidă, de la baza eprubetei, se numeşte *sediment*.

IV.3.2. Clasificarea tehnicilor de centrifugare

Există mai multe moduri de clasificare a centifugării.

Centrifugarea analitică şi centrifugare preparativă

Cele mai comune două tipuri de centrifugare sunt *analitică şi preparativă*; diferenţa dintre acestea este reprezentată de scopul centrifugării.

BCU IAŞI / BIBLIOTECA UNIVERSITARĂ

Centrifugarea analitică implică măsurarea proprietăţilor fizice ale particulelor care sedimentează, precum coeficientul de sedimentare sau greutatea moleculară.

Centrifugarea *preparativă* are ca obiectiv izolarea unor particule specifice care să poată fi utilizate, ulterior, în scop analitic. Există mai multe tipuri de centrifugare preparativă, precum *centrifugarea zonală, diferenţială, izopicnică.*

Ultracentrifugarea/Centrifugarea la viteză mică

Un alt sistem de clasificare este în funcţie de turaţia sau viteza de rotaţie a centrifugii. Ultracentrifugarea are loc la viteze mai mari de 20000 rpm iar centrifugarea clasică are loc la viteze sub această valoare. Centrifugarea la viteză mică are loc, de regulă, la viteze sub 10000 rpm.

Ultracentrifugarea poate atinge viteze de rotaţie de 80 000 sau mai multe roţatii pe minut, astfel încât să genereze câmpuri de centrifugare depăşind 600000g, ceea ce este suficient pentru a sedimenta particule cu mase de peste 10000 Daltoni.

Ultracentrifugarea este utilizată pe scară largă în izolarea diferitelor organite, micromolecule şi macromolecule dintr-o varietate de ţesuturi şi celule. De fapt este aplicabilă oricărui ţesut moale şi s-a dovedit a fi un instrument important în separarea populaţiilor de celule sau în separarea unei largi varietăţi de celule provenind din diferite ţesuturi şi specii. Pin ultracentrifugare s-a reuşit separarea diferitelor tipuri de leucocite.

Ultracentrifugarea trebuie să aibă loc la temperaturi scăzute (sisteme de răcire) şi de preferinţă rapid, ceea ce o face o metodă foarte indicată pentru studiul şi omogenitatea particulelor biologice instabile. Faptul că nu necesită mult material întrucât volumul recipientului de centrifugare este mai mic de 1mL este adecvat cercetării biomedicale.

Folosind ultracentrifugarea se pot determina coeficientul de sedimentare, greutatea moleculară, coeficientul de difuziune şi concentraţia substanţelor precipitatului. S-a demonstrat că metoda poate fi folosită în separarea particulelor de ordinul nanometrilor *(25).*

Ultracentrifugarea are, de asemenea, şi unele dezavantaje:

Dificultatea şi complexitatea: Ultracentrifugarea implică numeroase şi diferite tipuri de echipament, uneori foarte complex; reproductibilitatea rezultatelor depinde atât de aparatul folosit cât şi de cunoştinţele operatorului despre metodă.

Probleme de sedimentare: larga paletă de dimensiuni a unei singure specii sau a unor organite dintr-un singur tip de celule poate crea dificultăţi de sedimentare. Dintre toate componentele subcelulare, membrana plasmatică este printre cele mai dificil de izolat de la un ţesut la altul din cauza variaţiilor mari de densitate şi dimensiuni.

Unele organite au proprietăţi de sedimentare similare, precum mitocondriile şi lizozomii, ceea ce face separarea prin ultracentrifugare o sarcină dificilă în acest caz. Particule mici cu mase de cel mult 5Da nu vor sedimenta uniform nici măcar la turaţiile ridicate ale ultracentrifugii.

Timpul de centrifugare: dacă probele sunt centrifugate prea puţin timp moleculele nu se vor separa suficient, iar dacă proba este centrifugată mai mult decât necesar, atunci toate moleculele vor sfârşi prin a precipita la baza eprubetei.

Temperatura trebuie menţinută între anumite limite: temperaturile prea înalte pot

degrada proba, iar temperaturile prea joase pot creşte viscozitatea soluţiilor afectând astfel agregarea. Pentru a evita supraîncălzirea şi, ca urmare, degradarea proteinelor, ultracentrifuga este întotdeauna prevăzută cu un sistem de răcire.

Centrifugarea zonală şi Centrifugarea izopicnică

Există două forme de centrifugare în gradient de concentraţie: *zonală şi izopicnică.*

În *centrifugarea zonală* proba este aplicată într-o zona îngustă de la vârful eprubetei de centrifugă, pe un gradient de densitate. Sub acţiunea forţei de centrifugare particulele vor începe să sedimenteze prin gradient în zone separate, în relaţie cu forma, mărimea şi densitatea lor.

În *centrifugarea izopicnică*, soluţia conţine o gamă mai largă de densităţi. Gradientul de densitate conţine întreaga gamă de densităţi ale particulelor din probă. Particula este amestecată uniform cu materialul de gradient. Fiecare particulă va sedimenta doar pe poziţia din eprubeta din centrifugă unde gradientul de densitate este egal cu propria sa densitate, şi acolo va rămâne. Aşadar, tehnica izopicnică separă particulele în zonă exclusiv pe baza diferenţelor de densitate, independent de timp.

Particulele din probă vor migra automat către stratul cu aceeaşi densitate cu a lor.

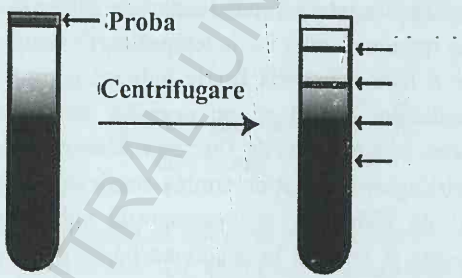


Figura IV.3.2. Exemplu de separare a unor componente celulare prin centrifugare în gradient de concentraţie (124)

Când se foloseşte un număr de centrifugări cu diverse viteze şi timpi în scopul de a separa diferiti compuşi, centrifugarea este numită *diferenţială.* De exemplu, după omogenizarea celulelor, citoscheletul poate fi separat de citoplasmă şi soluţia tampon folosind *centrifugarea diferenţială.* (vezi ***Capitolul IV.4***)

N.B. Noţiunile din acest capitol trebuie completate cu noţiunile cuprinse în *Capitolul 21. Centrifugarea şi Ultracentrifugarea*, din cartea de *Lucrări practice şi demonstraţii de Biofizică şi Fizică medicală*, 2003, V.Rusu şi colab.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.4. Etape în fracţionarea unui eşantion subcelular

Pentru a analiza un compus subcelular sau a unei anumite molecule din celulă prin *metode analitice*, aceasta trebuie să fie mai întâi separată din celulă prin *metode de separare* adecvate. Să ne închipuim că dorim să dozăm receptorii nucleari din celulele tumorale la o pacientă cu neoplasm de sân, şi anume receptorii pentru hormoni estrogeni. Alegerea unui posibil tratament specific, cu antiestrogeni, al pacientei, va depinde, personalizat, de procentul de astfel de receptori celulari. Cum îi vom separa? Urmărind etapele de separare, vom avea un exemplu de algoritm de lucru.

Prima etapă este separarea celulelor şi ruperea membranelor. Pot fi utilizate:

- *Omogenizarea mecanică*
- *Şocul osmotic*
- *Ultrasonicarea*
- *Extragerea chimică*

Etapa a doua este complexă şi constă într-o *centrifugare diferenţială sau preparativă*, care include mai multe centrifugări cu viteze din ce în ce mai mari, ce vor separa componentele celulare în funcţie de mărime şi densitate.

Trebuie să reţineţi că pe măsură ce creşte viteza şi durata centrifugării, cu atât dimensiunile componentelor celulare separate în sediment vor fi mai mici. De exemplu (vitezele de centrifugare şi fracţiunile celulare separate):

- Viteză mică (1000g x 10 min): celule întregi, nuclee, citoskelet
- Viteză mică (20000g x 20 min): mitocondrii, lizozomi
- Viteză mare (80000g x 1h): microzomi, vezicule intracelulare mici
- Viteză foarte mare - ultracentrifugare (150000g x 3h): ribozomi, macromolecule mari.

Trebuie reţinut că vitezele de centrifugare şi intervalele de timp de mai sus pot fi uşor modificate, cu rezultat similar (a se vedea şi figura următoare).

Se poate utiliza şi centrifugarea în gradient de densitate, de exemplu la viteză mare (500000 x g) în gradient de sucroză (e.g., 5-20% sucroză), care va permite separarea componentelor celulare pe baza densităţii lor, în straturile corespondente ca densitate.

Sedimentul obţinut în fiecare etapă include componente celulare corespunzătoare parametrilor centrifugării (viteză de centrifugare, timp), după cum se observă din schema alăturată şi din celelalte prezentate la curs; acestea vor putea fi, ulterior, analizate prin metode analitice, de exemplu prin tehnici de microscopie optică sau microscopie electronică.

BCU "IULIU HAŢIEGANU" UNIVERSITY LIBRARY

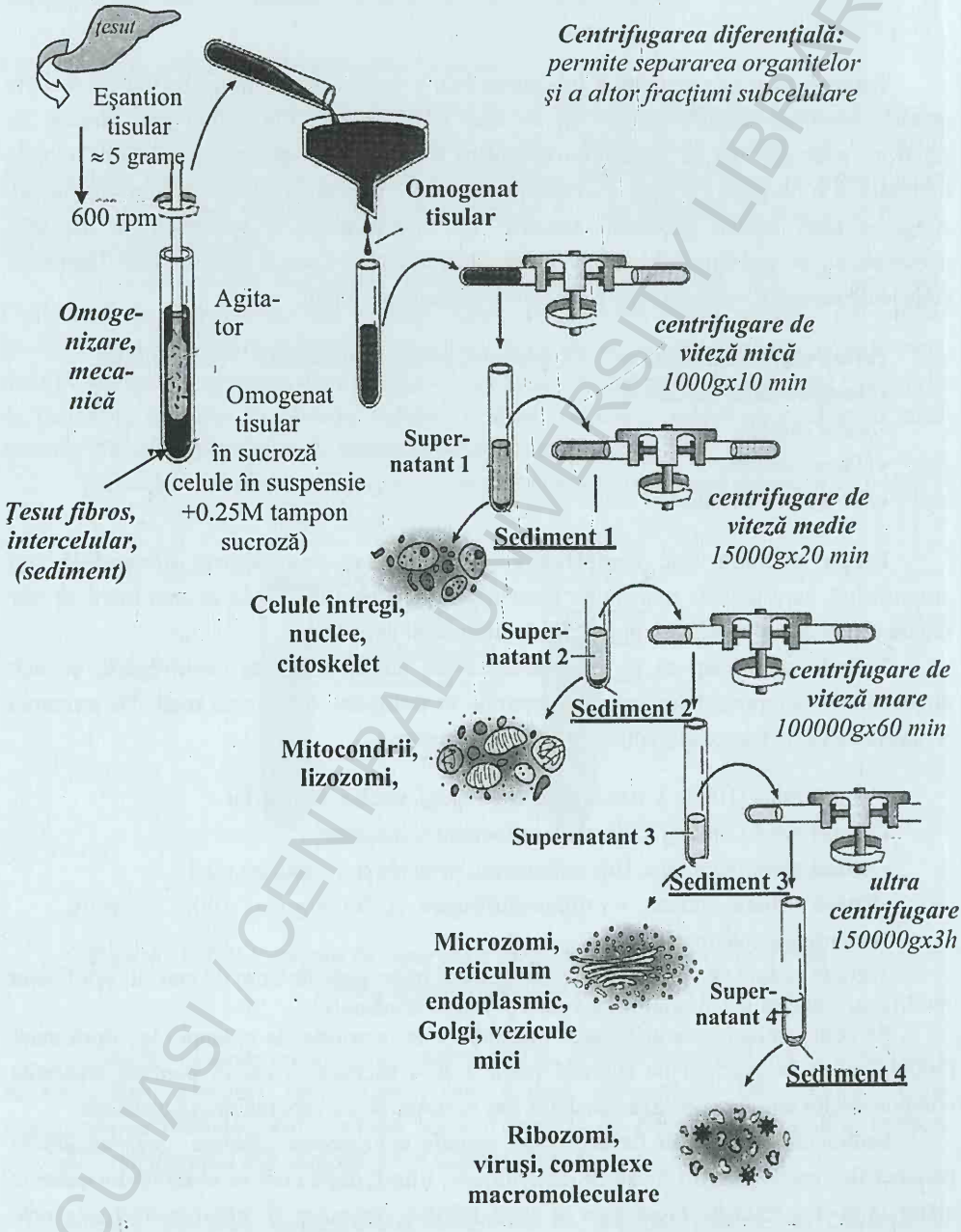


Figura IV.5.1. Reprezentare schematică a etapelor principale în separarea unor compuși subcelulari (107)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.5. Liofilizarea

Liofilizarea (numită și *uscare prin congelare sau uscare la rece, „freeze-drying"*) este o metodă utilizată pentru a păstra proprietățile biologice active ale unor compuși nemodificate pentru o perioadă lungă de timp. Se folosește pentru medicamente sau alte produse, dar și pentru alimente (cafeaua instant pe care, poate, o bem în fiecare dimineață este liofilizată, la fel și anumite preparate îndeosebi pentru alpiniști, feluri de mâncare pentru cosmonauți etc.) Procesul face posibilă îndepărtarea apei conținute în alimente sau în produse pentru a le face stabile la temperatura ambiantă și pentru a facilita astfel, conservarea acestora.

Principiul metodei

Uscarea prin înghețare folosește un principiu fizic simplu numit *sublimare*. Sublimarea reprezintă trecerea directă a unui element din stare solidă în stare gazoasă, fără a trece prin starea lichidă, fiind un proces endotermic (680 kcal apă/kg). Deci, *uscarea prin congelare* constă în sublimarea gheții dintr-un produs congelat, fără a trece prin apă lichidă.

Acest proces, realizat în dispozitive numite *liofilizatoare*, are loc în două etape esențiale, cu unele particularități în funcție de procedeu:

1. **Congelarea** (etapa de *înghețare*, care poate fi în azot lichid, la -194,5°C): în primul rând, produsul trebuie adus la o temperatură suficient de scăzută unde trebuie să rămână în timpul procesului de uscare prin congelare.
2. **Deshidratarea/desicarea** (etapa de *uscare*). In esență, în această etapă produsul este supus unui vid parțial, prin reducerea presiunii (10-20 mm col Hg), realizându-se sublimarea, cu înlăturarea vaporilor de apă. Include două subetape:
   - **Desicarea primară (sau exact procesul de *sublimare*):** corespunde sublimării gheții produsului. Viteza de deshidratare este o funcție a diferenței presiunilor parțiale dintre vaporii de apă și gheață, fiind mai mică de 1,5 kg/(m^2h) în unele cazuri.
   - **Desicarea secundară (sau desorbția):** când toată gheața a dispărut, temperatura crește spontan (reacție endotermică). Această temperatură de 20-70°C timp de 2 până la 6 ore face posibilă îndepărtarea apei legate, neînghețată.

Dacă acestea sunt etapele esențiale, în funcție de natura produsului inițial sau a alimentului și de scopul final, tehnologia poate include și alte etape.

În practică, ciclul de obținere a unui produs alimentar liofilizat, de exemplu, este după cum urmează:

- preconcentrarea produsului și zdrobirea produselor solide; concentrarea trebuie făcută la temperatură scăzută pentru a se rezulta un produs de calitate;
- congelarea produsului la -40°C: această congelare se poate face în liofilizator;

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- producerea vidului: producerea de vid cu presiuni mai mici de 610 Pa se face cu două pompe de vid; azotul lichid poate fi, de asemenea, utilizat;
- sublimarea sau deshidratarea primară până la o umiditate de aproximativ 15%, la o temperatură mai mică de -25°C;
- desorbția sau deshidratare secundară până la o umiditate reziduală de 2% la o temperatură cuprinsă între 20 și 40°C timp de 2 până la 6 ore, în funcție de grosimea produsului;
- introducerea unui gaz neutru (de exemplu dioxid de carbon) pentru a evita recuperarea umidității. Aceasta durează aproximativ 20 de minute.

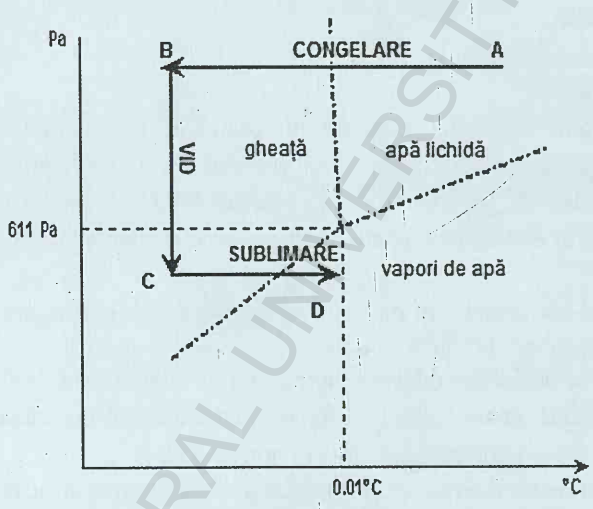


Figura IV.4.1. Diagrama etapelor sublimării (7)

Liofilizarea este folosită în multe domenii ; de exemplu, este utilizată în medicină și farmacie pentru a prepara pulberea pentru unele antibiotice sau moleculele vectoare pentru prepararea radiofarmaceuticelor în *Laboratorul de Medicină nucleară.*

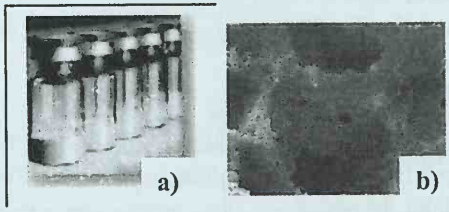


Figura IV.4.2. Diferite tipuri de produse liofilizate.
a) antibiotice pentru preparate injectabile; b) lipozomi uscați prin înghețare (126)

Alte procese mai complexe, cum ar fi separarea pulberii de albumină de plasmă în

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

totalitate utilizează, de asemenea, liofilizarea.

În acest caz, pașii vor fi:

1. recoltarea plasmei
2. separarea albuminei de plasmă
3. înghețarea albuminei la o temperatură foarte scăzută (-166°C)
4. introducerea acestui compus într-un recipient vidat în care are loc procesul de sublimare; rezultă o pulbere, care va fi introdusă, steril, în recipiente vidate, care vor fi închise ermetic, ulterior.

Liofilizarea este o tehnică de conservare foarte potrivită pentru a menține calitatea produselor fragile și conservarea lor, dar și foarte costisitoare în raport cu energia utilizată (aproximativ 1500 kWh sunt necesare pentru a elimina 1000 litri de apă).

Se pot reține o serie de ***avantaje*** **ale metodei de liofilizare :**

- Conservarea proprietăților biologice.
- Produsele se pot păstra la temperatura camerei, nu necesită refrigerare (foarte utilă în cazul bacteriilor lactice, foarte sensibile la căldură).
- Produsele își păstrează forma și culoarea, chiar si mirosul, uneori.
- Scade greutatea (transport ușor - cost mai mic) dar volumul nu se modifică semnificativ.
- Se rehidratează ușor, prin adăugarea unui lichid (apă sau alt lichid fiziologic, de la caz la caz, în funcție de produsul liofilizat).

Alte tipuri de aplicații sunt exemplificate pe slide-urile de la curs.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.6. Tehnici de microscopie optică

D.p.d.v. istoric, primul pas în studiul ştiinţific al luminii a fost făcut de ***Euclid,***
în anul 300 Î.H., care a scris:
'Lumina călătoreşte în linii drepte numite raze'.

Toate tipurile de microscoape, fie ele optice sau electronice, funcţionează după aceleaşi principii, se supun aceloraşi legi fizice, şi, în general, sunt construite din părţi constitutive esenţiale similare, funcţional. Orice microscop conţine o *sursă de "iluminare"* care emite o *formă de radiaţie*, care va fi *focalizată*, prin intermediul unui sistem de *lentile*, pe proba de examinat.

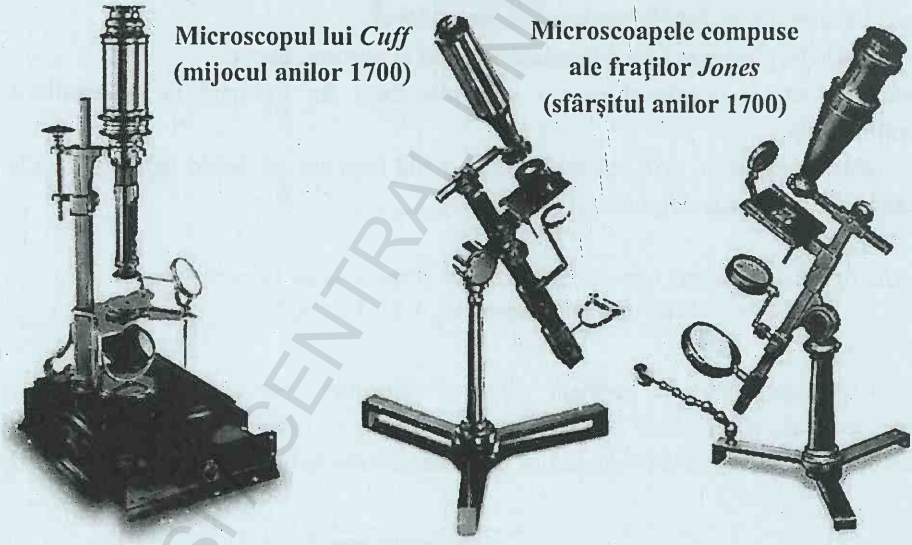


Figura IV.6.1. Trei dintre primele microscoape optice *(127)*

De la primele modele de microscop şi până în prezent a existat o evoluţie remarcabilă. Pornind de la prototipul celui mai simplu model de *microscop optic*, au fost dezvoltate noi tehnici de vizualizare cu scopul de a vizualiza şi analiza cu rezoluţie cât mai bună, diferite obiecte sau procese. În prezent, oamenii de ştiinţă utilizează, de exemplu, *microscopia de transmisie (TEM)* pentru rezoluţia ei spaţială extraordinară, *microscopia de baleiaj (SEM)* pentru examinarea tridimensională a suprafeţelor şi a structurilor biologice, sau microscopia cu posibilitate de marcare a unor structuri celulare, cum ar fi *microscopia cu fluorescenţă*.

© UAIC IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

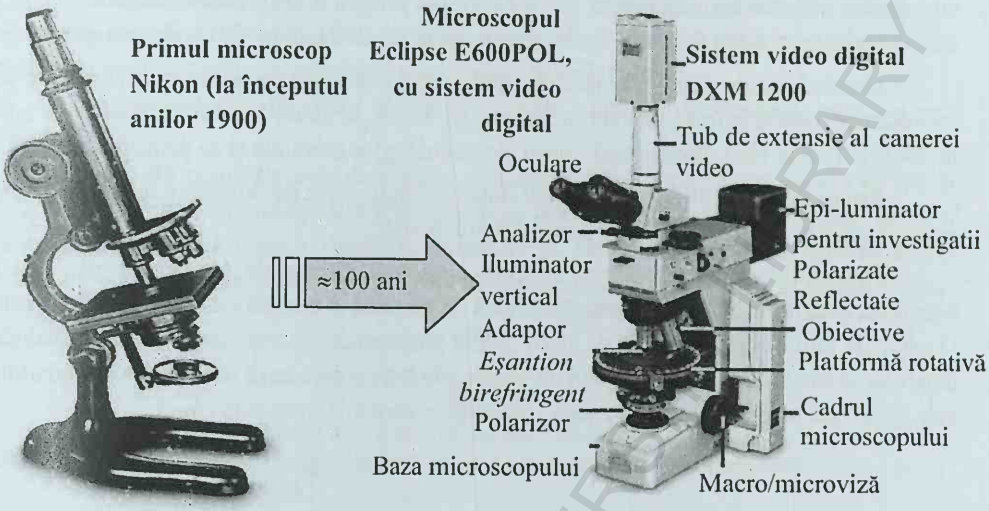


Figure IV.6.2. Exemplu de evoluție a microscopiei optice (Nikon, 127)

Microscopul optic obișnuit (microscopul în câmp luminos)

Principiul fizic : Un microscop optic reprezintă, în esență, o succesiune de lentile convergente din sticlă, plasate pe un ax comun, pe care se pot și deplasa, ceea ce dă posibilitatea modificării distanței dintre ele în scopul focalizării optime, cum se întâmplă și la aparatul de fotografiat.

Microscopia este o metodă excelentă de analiză a țesuturilor și celulelor, pe eșantioane (numite, uneori, cu un neologism, *specimene*), în afara organismului (*in vitro*). Ea este, adesea, etapa finală care succede unei centrifugări diferențiale, realizată în scop separativ, în vederea analizei detaliate a structurilor organismului, la diferite niveluri, în raport cu rezoluția microscopului. Medicul apelează mereu la metode de microscopie, care sunt decisive atât pentru diagnosticul bolii cât și pentru tratament, de exemplu în boli infecțioase sau în cele neoplazice. Tratamentul corect în cazul unei faringite severe (clasica *durere în gât* febrilă și severă, pe scurt) se face pe baza exudatului faringian care implică, ca etapă finală, o examinare la microscop a microorganismelor recoltate, inițial, din orofaringe (veți detalia tehnica la *Microbiologie*). A ști ce microorganisme pot fi vizualizate în microscopia optică (bacteriile, de exemplu) și care doar în microscopia electronică (virusurile) înseamnă a cunoaște *limita de rezoluție* și *caracteristicile* fiecărui tip de microscopie, ceea ce este necesar fiecărui medic. Diagnosticul de certitudine în cazul unei tumori maligne implică, de asemeni, o examinare microscopică a biopsiei din tumora suspect malignă (*examenul anatomo-patologic*). Dorința medicului de a înțelege structurile vii cât mai în detaliu a fost și continuă să fie motorul dezvoltării microscopiei, a apariției de diferite tipuri de microscopie, care să aibă rezoluție din ce în ce mai mare și să evidențieze caracteristici structurale ale materiei din diferite puncte de vedere, completând analiza structurală. Nu este, deci, surprinzătoare, având în vedere

importanța domeniului, acordarea de mai multe *premii Nobel* pentru diferite tipuri de microscoape inventate (fizicianul de origine română *Stefan Hell*, în 2014, de exemplu).

Caracteristicile fizice ale microscopului optic obișnuit, precum și exemple de alte microscoape optice și imagini, sunt prezentate în detaliu la lucrările practice și demonstrative de *Biofizică* ; aici vom discuta doar cîteva elemente logice esențiale și de principiu.

Sursa de lumină: La microscopul optic obișnuit, sursa de iluminare este o lampă care emite *lumină în spectrul vizibil* (în general, lumină albă).

Principiul de funcționare: Lumina, focalizată de lentila **condensor** pe lama de examinat, este transmisă prin **proba biologică** de pe lamă și captată de **lentilele obiectivului**. O parte din lumină este absorbită de probă, astfel producându-se contrastul necesar vizualizării detaliilor structurale. Lumina captată de lentila obiectiv traversează și **lentilele ocularului** și este focalizată pe retina globului ocular, moment în care imaginea este *clară*.

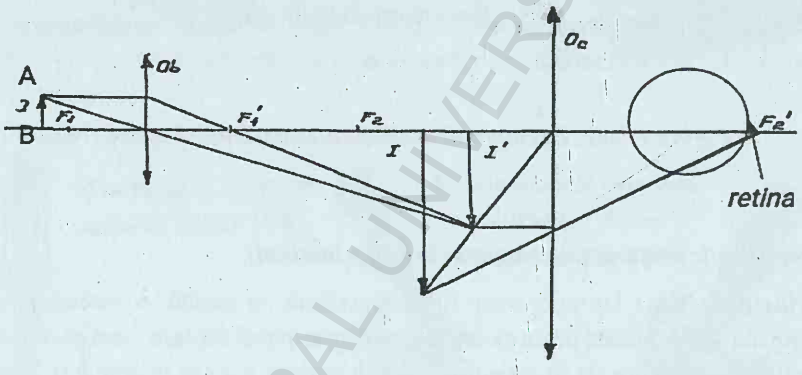


Figura IV.6.3. Formarea imaginii la microscopul optic

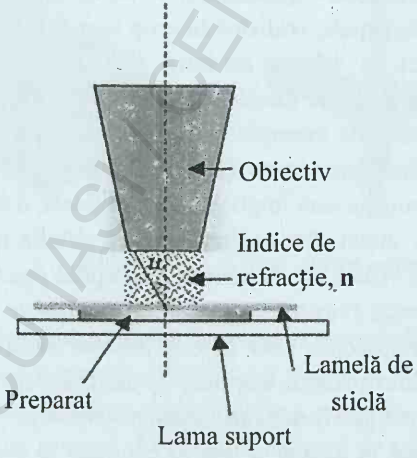


Figura IV.6.5. *Apertura numerică*

Apertura numerică (NA) a unei lentile se calculează după formula de mai jos, unde: ***u*** este unghiul de deschidere a conului luminos, ***n*** este indicele de refracție a mediului care se interpune între *obiectiv* și *preparat*:

$$NA = n \cdot \sin u$$

Atunci când mediul interpus între preparat și lentila obiectiv este *aerul*, apertura numerică este de 1, în timp ce atunci când acest mediu este *uleiul de cedru,* valoarea aperturii numerice crește la 1,4 (*microscopia cu imersie*).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Avantajele microscopului optic în vizualizarea celulelor şi ţesuturilor constau în capacitatea de a magnifica imaginea probelor examinate şi, esenţial, de a le studia detaliile structurale printr-o *putere de rezoluţie,* inaccesibilă ochiului uman.

Dintre caracteristicile fizice ale microscopului, **puterea de rezoluţie** este cea mai importantă:

Limita de rezoluţie este definită ca distanţa minimă dintre două puncte ce pot fi observate ca fiind două entităţi distincte. Rezoluţia microscopului este dependentă, pe de o parte, de lungimea de undă a sursei de iluminare şi, pe de altă parte, de caracteristicile sistemului optic, şi poate fi calculată prin ecuaţia (dacă **d** scade, puterea de rezoluţie creşte):

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin u}$$

*unde: **d** este inversul puterii de rezoluţie,*
*λ lungimea de undă a sursei, iar **n * sinu** este apertura numerică*

Astfel, în condiţii optime, limita teoretică a rezoluţiei pentru microscopul optic este de aproximativ ***0,1 μm.***

Punctele situate la o distanţă mai mică decât aceasta, unul în raport cu celălalt, vor fi observate ca un singur punct. În realitate, puterea de rezoluţie a microscopului nu va avea valoarea optimă din pricina *aberaţiilor şi a imperfecţiunilor sistemului optic*; în consecinţă, rezoluţia celui mai bun microscop optic este în jurul valorii de ***0,2 μm.*** Comparativ cu sistemul optic uman, această valoare a rezoluţiei este de ***1000 de ori mai mare.***

Rezoluţia (puterea de rezoluţie) şi **magnificarea (puterea măritoare)** nu sunt sinonime: o imagine poate fi mărită la orice dimensiune, dar dacă punctele învecinate vor fi mai apropiate de 0,2 μm, se vor vizualiza ca o singură entitate, în microscopia optică obişnuită.

Puterea de măritoare poate fi calculată prin următoarea formulă:

$$P = \frac{u'}{AB}$$

*în care **u'** reprezinta unghiul de incidenţă al obiectivului iar*
AB este dimensiunea obiectului examinat

Orice microscop optic are la bază modelul microscopului optic obişnuit, în care obiectul studiat este mărit de obiectiv, iar imaginea rezultată este mărită de al doilea sistem de lentile (ocularul). Astfel, puterea de mărire a microscopului este şi *produsul dintre cea a obiectivului şi cea a ocularului.* Intervalul de mărire al obiectivului este între **4x** şi **100x.** Din cauza restricţiilor spaţiale pentru corecţia imaginii şi iluminare, obiectivele cu putere de magnificare sub 4x nu sunt indicate. În acelaşi timp, ca urmare a limitărilor impuse de capacitatea de captare a luminii şi a spaţiului restrâns de lucru, nici obiectivele cu putere de magnificare peste 100x nu au utilitate. Sistemul optic al ocularului are o putere de magnificare între 8x şi 12x, dar lentilele de **10x** sunt cel mai des utilizate. Astfel, ***un microscop standard va oferi o plajă de mărire între 40x şi 1000x.***

În procesul de formare a imaginii microscopice mai pot avea loc şi alte fenomene : aberaţiile.

Interacţiunea fasciculului de lumină cu sticla din lentile introduce anumite *aberaţii* care duc la degradarea calităţii imaginii finale, deoarece razele de lumină sunt deviate, sau refractate, diferit în funcţie de zonele de lentilă traversate, iar anumite lungimi de undă sunt refractate selectiv în funcţie de tipul de sticlă. *Aberaţiile spaţiale* (numite şi *aberaţii sferice*) pot fi corectate prin utilizarea unor lentile cu suprafeţe neuniforme, iar *aberaţiile cromatice* (numite şi *de culoare*) pot fi reduse prin încorporarea a mai multor tipuri de sticlă, în combinaţie, în acelaşi obiectiv (*lentile apocromatice*). Lentilele obiectivului pot fi şi *acromatice*, fiind adecvate examinării cu sursă de lumină verde. Pentru aceste lentile se instalează filtre pentru lumina verde, interpuse între condensor şi suportul probei. Lentilele acromatice nu sunt adecvate examinării la rezoluţii mari cu lumină albă, deoarece lumina roşie şi albastră din spectru nu se proiectează în acelaşi plan ca lumina verde.

În examinarea probelor biologice, undele de lumină pot fi distorsionate/întârziate în cursul traversării zonelor mai mult sau mai puţin dense ale celulelor şi ţesuturilor din probă. Aceste efecte de deviere/întârziere ale undelor de lumină pot fi exploatate pentru a studia aspecte detaliate ale celulelor vii şi a ţesuturilor neprelucrate, dezvoltându-se, astfel, tipuri diferite de microscopie (principiu descris în cele ce urmează).

Aberaţia sferică

Acest tip de distorsiune apare în cazul lentilelor cu suprafeţe sferice, la care regiunile periferice ale lentilelor focalizează razele la o distanţă focală mai mică decât regiunile centrale.

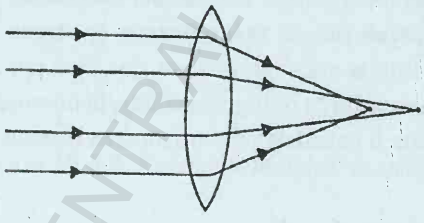


Figura IV.6.6. Aberaţie sferică. Lumina din periferia lentilei este focalizată mai aproape de lentilă decât cea din regiunile centrale

Astfel, imaginea unui punct va deveni un cerc mic, şi, ca urmare, distanţa cea mai mică dintre două puncte care pot fi observate separat va fi mai mare decât teoretic, puterea de rezoluţie fiind limitată de acest fenomen.

Acest fenomen are loc şi la nivelul sistemului de lentile al globului ocular, dar este corectat prin două caracteristici: corneea este mai plată în periferie decât în centru, iar lentilele (corneea şi cristalinul) au densitate mai mare în centru, refracţia fiind mai accentuată în zona centrală decât în regiunile periferice.

Aberaţia cromatică

Orice lentilă alcătuită dintr-un singur material are un indice de refracţie mai mare pentru razele cu lungime de undă mică, distanţa focală fiind mai mică pentru lumina albastră

în comparaţie cu lumina roşie, de exemplu. Astfel, imaginea unui punct de lumină albă nu va fi tot un punct alb ci va fi un cerc nedefinit, cu multiple tonuri de culoare circumferenţial, fenomen ce influenţează calitatea imaginii şi necesită corecţie.

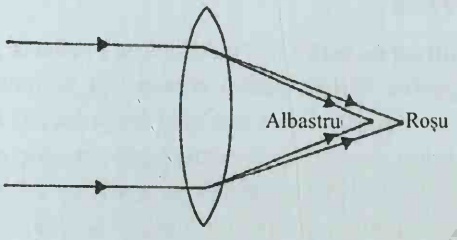


Figura IV.6.7. Aberaţie cromatică. Razele cu lungime de undă mică sunt focalizate mai aproape de lentilă decât razele cu lungime de undă mare

La nivelul globului ocular, aberaţia cromatică este de nivel moderat, între roşu şi intervalul albastru-verde al spectrului luminii albe, dar se amplifică rapid pentru lungimi de undă mici - albastru, violet.

Sistemul de iluminare

Un factor esenţial în obţinerea unei imagini de calitate cu microscopul optic este de a avea o *intensitate adecvată a iluminării probei* de pe lamă. În plus, pentru o examinare optimă, distribuţia iluminării ar trebui să fie *uniformă* în câmpul de examinare.

În acest sens, se interpune, între sursa de lumină şi suportul probei de examinat, o altă lentilă numită *condensor*, aceasta fiind, de obicei, o lentilă plană, mare, situată imediat sub platforma microscopului. Fiind montat pe un şasiu culisabil, poziţia condensorului poate fi modificată astfel încât să focalizeze fasciculul de lumină pe preparatul de pe lamă şi să controleze intensitatea şi uniformitatea iluminării. Sistemul de iluminare poate fi prevăzut şi cu două mecanisme pentru a regla diametrul fasciculului de lumină, care acţionează ca *diafragmă*. Unul dintre acestea, denumit *diafragma condensorului*, permite creşterea contrastului, dar în detrimentul rezoluţiei. Cel de-al 2-lea mecanism, *diafragma aperturii* câmpului de iluminare, nu influenţează întra-atât de mult rezoluţia, şi, în general, este ajustat pentru a obţine o iluminare optimă în câmpul de examinare.

Modul de obţinere a iluminării optime în preparat îl veţi deprinde la lucrările practice, fiind determinant pentru calitatea imaginii obţinute.

Tipuri de microscoape optice

Unele proprietăţi ale probelor de examinat nu pot fi puse în evidenţă doar de microscopul optic obişnuit. Ochiul uman poate discrimina detalii ale obiectelor doar prin diferenţele în gradul de iluminare sau de culoare. Acest lucru este în relaţie cu absorbţia diferenţiată a luminii de către detaliile obiectului examinat.

Totuşi, obiectul poate avea caracteristici necesare a fi puse în evidenţă, dar care nu au suficient, sau nu au deloc, contrast de culoare sau iluminare. Când avem de-a face cu componente transparente sau incolore ale celulei, tehnicile de colorare sunt o alternativă dar,

IOAN CUZA UNIVERSITY LIBRARY

totodată, interferă cu toate procesele celulare. Pornind de la această observație, s-au dezvoltat tipuri alternative de microscopie.

Microscopul în contrast de fază

Microscopia în contrast de fază a fost inventată de **Frederik Zernike**, care, în 1953, a primit premiul **Nobel pentru Fizică**, pentru aceasta. Ea permite studiul celulelor vii, neprelucrate; de exemplu, diviziunea celulară este unul din procesele celulare examinate.

Principiul care stă la baza acestui tip de microscopie constă în exploatarea diferențelor discrete ale **indicelui de refracție** pentru diferitele componente celulare, consecința fiind o creștere a contrastului între detaliile preparatului biologic studiat, în absența colorării. De exemplu, lumina care străbate regiuni mai dense ale celulei, ca nucleul, va fi întârziată/transmisă diferit în comparație cu lumina care traversează regiuni mai puțin dense ale celulei. Frânarea diferențiată a transmiterii luminii prin celulă determină un *decalaj de fază* în forma undelor de lumină (lumina fiind o undă sinusoidală) după trecerea prin regiunea nucleului celular față de undele din zone mai puțin dense ale celulei.

Microscopia în contrast de fază este un tip de microscopie optică în care contrastul obiectelor transparente este mărit prin influențarea drumului undelor de lumină refractate diferențiat.

Preparatele biologice necolorate, e.g. celulele vii, sunt transparente ochiului nostru, dar ele interacționează cu lumină într-o manieră relativ uniformă, prin frânarea transmiterii razelor luminoase cu ¼ din lungimea lor de undă. Prin frânarea suplimentară a unui grup de raze din fascicolul de lumină transmis, specimenul biologic induce decalajul de fază dintre razele din fascicol. Intensitatea (amplitudinea) este aditivă, iar razele luminoasă care sunt decalate din fază cu ½ de lungime de undă sunt percepute ca întuneric.

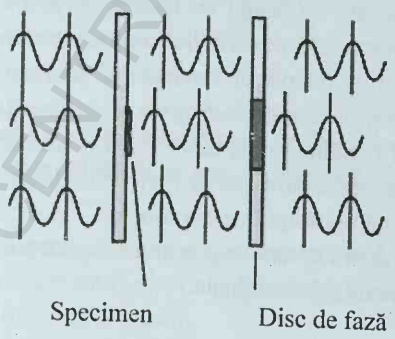


Figura IV.6.8. Discul de fază crește diferența de fază ½ de lungime de undă. În momentul proiectării imaginii la microscop, dacă cele 2 tipuri de unde vor interfera distructiv atunci obiectul va fi întunecat (132)

Decalajul de fază nu este sesizabil de către ochiul uman. Totuși, prin utilizarea unui disc de fază montat în microscop, diferența de fază poate fi crescută până la ½ din lungimea de undă, determinând o neuniformitate în gradul de iluminare a probei de pe lamă. Ca urmare, cu acest disc de faza, se va realiza o creștere a contrastului prin împerecherea undelor (întârziate

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

la ieşirea din preparat) iar diferenţe de fază invizibile vor fi transformate in diferenţe de amplitudine vizibile.

Prin această tehnică, regiunile transparente sau incolore ale preparatului vor contrasta cu elementele din jur.

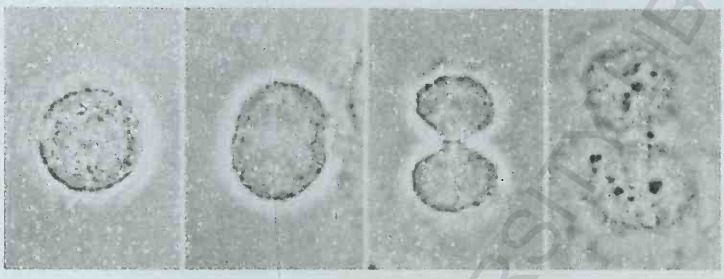
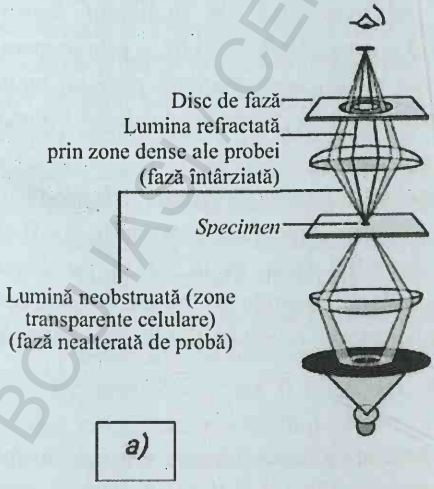


Figura IV.6.9. Ciclul celular, observat la microscopul în contrast de fază. Imaginile de mai sus prezintă 4 secvenţe diferite din cursul ciclului celular (132)

Sistemul optic al **microscopului în contrast de fază** prezintă, deci, câteva modificări ale lentilelor condensorului şi obiectivelor care permit razelor luminoase decalate să fie împerecheate cu alte raze decalate, rezultatul fiind *amplificarea contrastului.* O placă cu diametrul de câţiva mm sub formă de disc, *discul de fază*, este montată în planul focal al obiectivului, iar parametrii de iluminare sunt modificaţi corespunzător.

Orice microscop poate fi utilizat ca un microscop în contrast de fază dacă obiectivul standard poate fi înlocuit cu un obiectiv prevăzut cu *disc de fază.*


Disc de fază
Lumina refractată prin zone dense ale probei (fază întârziată)
Specimen
Lumină neobstruată (zone transparente celulare) (fază nealterată de probă)
a)

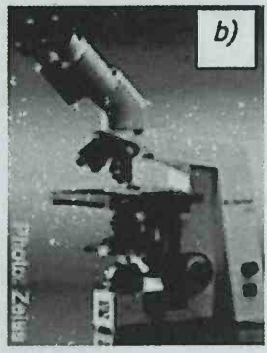


Figura IV.6.8. Microscopul cu contrast de fază: a) principiu fizic; b) microscop în contrast de fază Zeiss (132)

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

În concluzie, acest tip de microscop permite *conversia diferențelor indicelui de refracție în diferențe de contrast*. Astfel, componente celulare pot fi vizualizate în absența colorării și, implicit, a devitalizării probei biologice de examinat.

Microscopul de contrast prin interferență diferențială

Un alt tip de microscopie optică, **microscopia de contrast prin interferență diferențială (CID)**, exploatează caracteristicile refractive ale componentelor celulare pentru a obține imagini de calitate superioară a structurilor celulare. Microscopul CID are la bază principii similare microscopului în contrast de fază, diferența constând în prezența suplimentară a unor *prisme* și *polarizori* încorporați în sistemul optic al microscopului, pentru a genera contrast în structurile preparatelor biologice fixate sau nefixate.

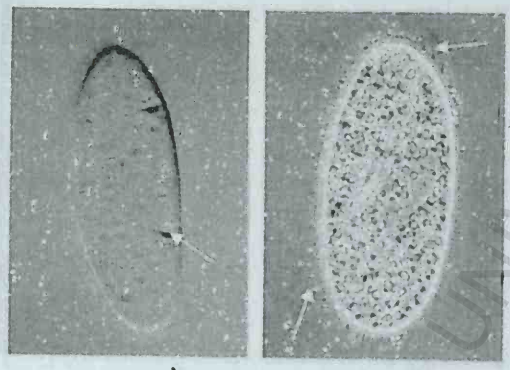


Figura IV.6.9. Imagine celulară (Paramecium) la: a) microscopie în contrast de interferență diferențială (depresiunea citosolică reprezintă o algă ingerată) și b) microscopie în contrast de fază (lizereu de cili mobili) - (107)

Microscopia în lumină polarizată

Microscopul cu lumină polarizată (pe care îl studiați și la Lucrările practice, a se vedea) permite studiul proprietății de *birefringență* a probelor biologice. Pe lângă sistemul de lentile standard, acest tip de microscop mai conține *două prisme Nicol* (o prismă polarizor și cealaltă analizor). Polarizorul se află imediat sub condensor iar analizorul deasupra obiectivului. Lumina polarizată (după ce traversează prisma polarizoare) trece prin preparatul de examinat, iar a 2-a prismă, analizorul, detectează modificarea orientării planului luminii polarizate, în relație cu interacția cu structurile moleculare din preparat. Analizorul poate fi rotit în jurul fascicolului de lumină ca pe o axă.

Structurile subcelulare cu o geometrie moleculară ordonată (de exemplu, fibrele fusului mitotic, granulele de amidon din cartofi, cuticula la ouăle de paraziți intestinali), pot fi clar vizualizate după ce prismele Nicol au fost rotite astfel încât axele lor să fie dispuse perpendicular una în raport cu cealaltă, iar câmpul microscopic se întunecă (extincție), deoarece ele influențează comportamentul luminii polarizate, rotesc planul luminii polarizate (și detaliile birefringente devin luminoase).

Fenomenul de birefringență

Orice fascicul de lumină proiectat într-o direcție vibrează, în mod obișnuit, în jurul axului de proiecție, în toate direcțiile *(lumina nepolarizată)*. Un fascicul de lumină căruia

direcţiile de vibrare i-au fost restricţionate la câteva planuri sau doar la un singur plan se numeşte *lumină polarizată.*

Atunci când lumina este transmisă printr-un obiect, aceasta interacţionează cu o parte sau cu toţi atomii şi moleculele din acel obiect. În timpul acestor interacţiuni, unele lungimi de undă din componenţa luminii sunt absorbite de atomi sau molecule, în timp ce altele sunt deviate. Interacţiunea luminii cu un obiect translucid produce o frânare discretă a fasciculului de lumină. Amplitudinea acestei frânări poate fi măsurată ca indice de refracţie caracteristic acelui obiect.

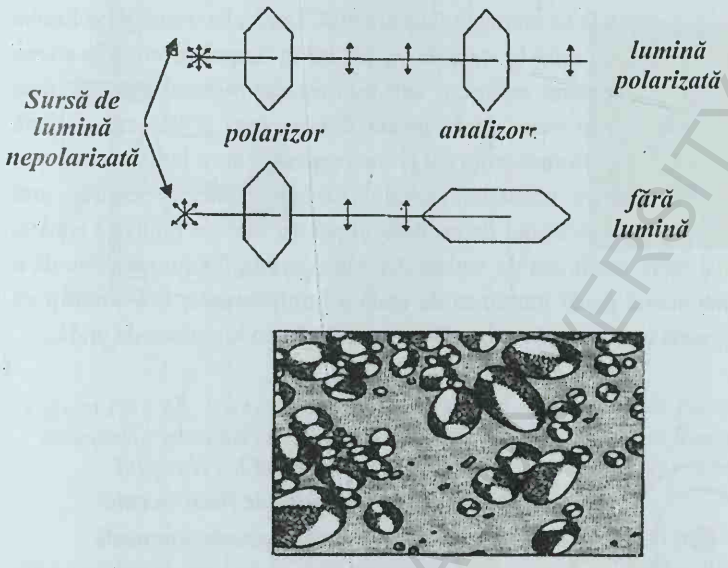


Figura IV.6.10. Sus: Poziţia prismelor Nicol si influenţa asupra fascicolului de lumină. Jos: Aspectul granulelor de amidon în microscopia polarizată - birefringenţa (114)

Pentru anumite obiecte, mai ales cele cu structură ordonată, pe anumite axe, similar unei reţele cristaline, interacţiunea cu fasciculele de lumină prezintă diferenţe mari, acestea fiind corelate cu orientarea obiectului în raport cu fasciculul de lumină incident. În consecinţă, indicele de refracţie are valori diferite pentru fiecare axă a obiectului, o astfel de structură cu indici de refracţie multipli fiind denumită *birefringentă.* Birefringenţa (indici de refracţie multipli) rezultă, deci, din aranjamentul atomilor sau moleculelor în diferite planuri ale obiectului; aceşti atomi sau molecule interacţionează mai mult cu razele incidente dintr-o anumită direcţie. Există două tipuri de birefringenţă:

- *intrinsecă*, fiind rezultatul dispunerii cristaline a atomilor sau moleculelor în anumite regiuni ale structurii (de exemplu, *cristale de calciu, membrane*)
- *birefringenţa de formă,* consecinţă a asocierilor supramoleculare dispuse în structuri paracristaline (de exemplu, *microtubulii din fusul mitotic*).

Birefringenţa poate fi observată direct prin microscopie în lumină polarizată, ca diferenţe în intensitate a luminii, în funcţie de axele structurilor cristaline sau paracristaline prin care este transmis fasciculul de lumină, aşa cum se va exemplifica şi la *lucrările practice.*

Microscopia de fluorescenţă

Microscopia de fluorescenţă este utilizată în scopul detecţiei structurilor celulare sau tisulare marcate cu un *emiţător de fluorescenţă (fluorofor sau fluorocrom)*.

La anumite categorii de atomi şi molecule, electronii absorb radiaţie de o anumită lungime de undă, cu energie suficientă pentru a determina un salt pe un nivel energetic superior, iar apoi pierd rapid această energie sub formă de căldură şi emisie de lumină (cu o energie mai mică decât cea absorbită şi, respectiv, lungime de undă mai mare). Dacă electronul îşi menţine direcţia de rotaţie (*spin-ul*), acesta intră în stare de *singlet*, iar tipul de lumină emisă în timp ce electronul revine la starea fundamentală se numeşte *fluorescenţă*. Dacă electronul îşi schimbă spin-ul după ce a primit energie, acesta intră în stare de *triplet*, iar în timpul revenirii la starea fundamentală va emite un tip de lumină cunoscut sub numele de *fosforescenţă*. Emisia *fosforescentă* are o durată în timp mai mare decât emisia *flourescentă* şi durează şi după întreruperea radiaţiei de excitare. Atât fluorescenţa cât şi fosforescenţa au o lungime de undă specifică fiecărui tip de electron care absoarbe energie. Ambele tipuri de emisie sunt dependente de lungimea de undă a fascicolului de excitare, şi pentru ambele tipuri de emisie, energia de excitare este mai mare decât cea de emisie. Cu alte cuvinte, lungimea de undă a luminii de excitare este mai scurtă decât lungimea de undă a luminii emise (va amintiţi că energia este direct proporţională cu frecvenţa şi invers proporţională cu lungimea de undă).

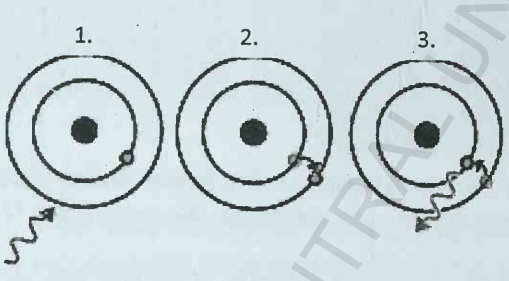


Figura IV.6.12. Principiul fenomenului de fluorescenţă

1. *Energia - absorbită de atom*
2. *Electronul sare pe un nivel superior de energie*
3. *Ulterior, electronul revine la starea fundamentală, prin emisie de fotoni – atomul este fluorescent* (62)

În tehnicile de biologie celulară şi moleculară, putem exploata fenomenul de fluorescenţă pentru reacţii de localizare, pentru a identifica molecule specifice în culturi de celule sau în celulă utilizând *markeri fluorescenţi*. Fluorescenţa are avantajul unui raport foarte bun semnal-zgomot de fond, ceea ce dă posibilitatea discriminării distribuţiei spaţiale a unor molecule chiar şi în concentraţie foarte mică. Pentru acest tip de microscopie, etapa premergătoare constă în marcarea preparatului biologic (de exemplu, *celulă, ţesut, gel*) cu un *fluorofor*, a cărui distribuţie va putea fi analizată după iluminare.

Microscopul cu fluorescenţă utilizează o combinaţie de filtre cu un separator cromatic (deseori fiind denumit şi *filtru dicroic*). Preparatul microscopic de pe lamă este iluminat cu fasciculul de excitare transmis prin obiectiv. Preparatul va emite fluorescenţă cu lungime de undă mai mare (corespunzătoare unei energii mai mici), ca răspuns la lumina de excitare cu lungime de undă mai mică (energie mai mare) . Astfel, lentilele obiectivului au dublă funcţie, atât de *iluminare* cât şi de *captare a imaginii*. Separatorul cromatic transmite sau reflectă

BCU "AL. I. CUZA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lumina, în funcţie de culoare (lungime de undă): va reflecta lumina cu lungime de undă scurtă iar lumina cu lungime de undă mai mare va fi transmisă.

Pentru a examina celulele în microscopia cu fluorescenţă, este esenţială cunoaşterea caracteristicilor spectrale ale fluoroforului utilizat precum şi utilizarea unei lame de control, pentru a ne asigura că celulele din preparat nu manifestă *autoflourescenţă excesivă* (în lipsa flouroforului), şi că fluoroforul utilizat este cel responsabil de distribuţia evidenţiată pe imagine.

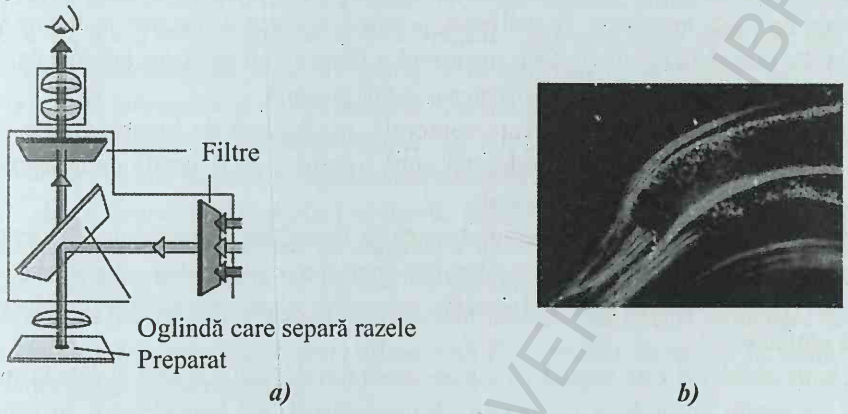


Figura IV.6.13. Microscopul cu flourescenţă : principiul de funcţionare (a) şi imaginea neuronilor marcaţi cu proteină verde fluorescentă (Green fluorescent protein-GFP)-hippocampus, la şoarece transgenic (b) (127)

Deoarece esenţa principiului de funcţionare a microscopului cu fluorescenţă este de a filtra lumina de iradiere a preparatului şi de a transmite lumina flourescentă emisă pentru a forma imaginea, printr-o serie de filtre, microscopul este prevăzut cu un filtru selectiv doar pentru lungimea de undă a razelor flourescente emise de preparat. Fasciculul de iradiere (adesea în domeniul UV) interacţionează cu atomii din proba de pe lamă iar electronii sunt excitaţi la un nivel energetic superior. În momentul relaxării la nivelul fundamental, aceştia emit lumină în spectrul flourescent. Pentru a fi vizibilă, lumina emisă este separată de fasciculul de lumină pentru excitare (de o intensitate mult mai mare), printr-un al 2-lea filtru. Pe câmpul microscopului, ariile flourescente strălucesc în contrast puternic cu fondul întunecat.

Prin marcarea cu flourofori, această tehnică a făcut posibilă identificarea cu înaltă specificitate a celulelor şi componentelor celulare. De exemplu, unele condiţii patologice sunt studiate prin marcarea unor anticorpi flourofori.

Fluroforul îşi poate pierde capacitatea de a emite fluorescenţa printr-un fenomen numit *photobleaching*, fenomen care poate fi redus prin utilizarea unor fluorofori mai puternici sau prin reducerea intensităţii luminii de excitare.

Microscopia optică cu scanare confocală

La microscopia de flourescenţă, lumina de excitare cedează energie electronilor din moleculele flouroforului, prezente în preparatul de pe lamă, iar, pe măsură ce electronii

excitaţi se relaxează la starea fundamentală, emisia flourescentă este evidenţiată *direct prin ocular, cu o cameră video, de exemplu.*

Prin *microscopia optică cu scanare confocală* au putut fi depăşite unele probleme inerente microscopiei în flourescenţă. Una dintre acestea constă în reducerea substanţială a raportului semnal-zgomot de fond prin eliminarea flourescenţei provenite din afara planului focal, care distorsionează claritatea imaginii. În plus, nici ochiul uman dar nici orice alt sistem de captură a imaginilor nu are fotodetectori suficient de sensibili încât să înregistreze flourescenţa de joasă intensitate. Astfel încât, pentru a produce o imagine în flourescenţă interpretabilă, câteodată este necesară o intensitate a fasciculului excitator într-atât de mare încât poate *fotooxida* (practic, *carboniza*) preparatul de pe lamă.

În microscopia optică cu scanare confocală, un fascicol de lumină dintr-o sursă LASER va scana, punct cu punct, preparatul după o matrice X-Y, creată de mişcările de vibraţie şi rotaţie ale unei oglinzi poligonale.

Formarea imaginii se face prin traducerea în intensităţi a punctelor X-Y scanate, printru-un tub fotomultiplicator. Valorile intensităţii sunt convertite analog - digital şi stocate pe computer. Un soft complex pentru procesarea imaginilor va permite analiza şi prelucrarea imaginilor obţinute.

Limita rezoluţiei este impusă de dimensiunea fasciculului LASER şi este în jur de *0,12-0,15 μm* pentru un preparat în condiţii ideale şi cu cel mai bun obiectiv. În general, microscopul pentru scanare confocală are montată o *diafragmă conică (pinhole)* în axul optic, la nivelul unui *plan conjugat*, în vecinătatea tubului fotomultiplicator. *Planul conjugat* reprezintă locul în care razele de flourescenţă emise converg într-un singur punct. Razele emise din alte planuri focale ale preparatului vor avea punctul de convergenţă mai sus sau mai jos decât planul conjugat în care se află diafragma pinhole. Din acest motiv, regiunile din imagine care ar corespunde planurilor din afara planului focal vor fi întunecate până la extincţie.

Astfel, se poate spune că microscopia optică cu scanare confocală, prin evidenţierea emisiei flourescente dintr-un singur plan, ne dă posibilitatea de a face o "secţiune optică" prin specimen.

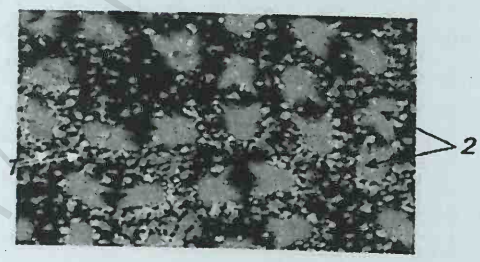


Figura IV.6.14. Aparatul Golgi (1)şi fusul mitotic (2) la un embrion de Drosophila în timpul mitozei (imagine prin microscopie confocala) - (130)

"Grosimea" secţiunii optice se apropie de limita de rezoluţie, dar în practică, rezoluţia pe axa Z este un pic mai mică, aproximativ *0,4-0,8 μm.*

Deoarece imaginile din microscopia confocală sunt stocate pe un calculator, acestea pot fi asamblate pentru a genera modele structurale de reconstrucţie tridimensională.

BCU IAŞI "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

Ultramicroscopia

Ultramicroscopul este, de fapt, un microscop optic cu o conformaţie particulară a sistemului optic, preparatul de pe lamă fiind iluminat din lateral cu un fascicul incident ce se proiectează perpendicular pe planul obiectivului. Diferenţa esenţială dintre ultramicroscop şi microscopul standard constă în proiectarea luminii din lateral, şi nu de sub lamă.

Acest tip de microscopie foloseşte principiul *efectului Tyndal*. *Efectul Tyndal* poate fi explicat ca fenomenul de dispersie a razelor provenite dintr-un proiector, de către particulele suspendate într-o soluţie, acestea devenind puncte luminoase, chiar dacă sunt sub limita de rezoluţie a microscopului respectiv. Astfel, traiectoria razelor de lumină poate fi observată într-o cameră întunecată ca un con strălucitor, numit şi *conul Tyndal*.

În consecinţă, la ultramicroscopie pot fi puse în evidenţă particule cu diametrul *mai mic de 100 nm*, invizibile, altfel, la microscopul optic obişnuit.

Dacă suspensia este perfect omogenă, atunci câmpul microscopului va fi întunecat, deoarece nu apare un fenomen de dispersie a fasciculului de lumină. Dar dacă suspensia conţine particule minuscule de diferite dimensiuni, razele împrăştiate de acestea vor fi observate de ochiul examinatorului pe fundalul întunecat ca puncte luminoase în continuă mişcare (*mişcare browniană*), ultramicroscopul fiind utilizat cu succes în studiul mişcării browniene a soluţiilor coloidale.

Dacă particulele sunt mult mai mici de 100 nm, acestea nu vor fi clar vizibile nici măcar în ultramicroscopie, dar fasciculul de lumină proiectat prin soluţie va fi transmis şi observat. Reciproca, atunci când particulele au dimensiuni de 1000 nm, de exemplu, dispersia luminii este într-atât de nesemnificativă încât fenomenul dispare iar soluţia va avea tot aspect omogen, caracterizat cu termenul *"nul optic"*. De exemplu, în cazul soluţiilor (care sunt amestecuri omogene solvit-solvent).

În prezent, tehnicile de microscopie optică şi electronică evoluează în combinaţii noi. De exemplu, ultramicroscopia poate fi cuplată cu microscopia electronică de baleiaj pentru a oferi noi modalităţi imagistice: ***Ultramicroscopia cu raze X.***

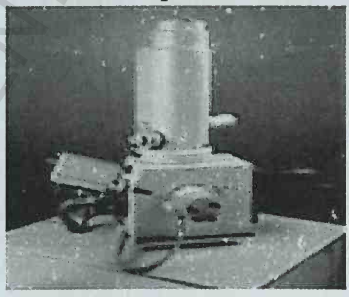
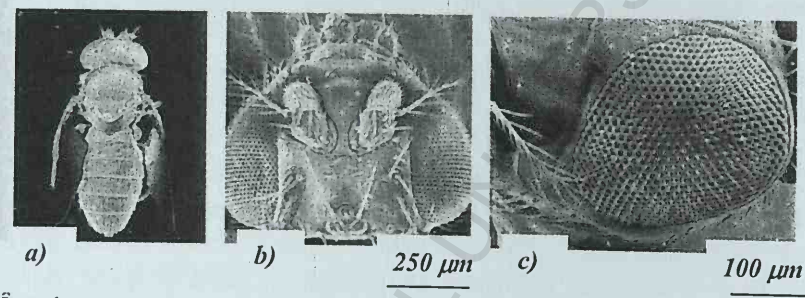


Figura IV.6.15. Ultramicroscopul cu raze X (127)

În comparaţie cu microscopia electronică sau ultramicroscopul clasic, ultramicroscopul cu raze X oferă imagini mai detaliate prin fuzionarea datelor imagistice din *contrast de fază* cu datele din *absorbţia razelor X*. Avantajele sunt posibilitatea microtomografiei, imagistică tridimensională şi prelucrarea imaginilor pe calculator, chiar dacă prepararea eşantionului de examinat este laborioasă.

IV.7. Tehnici de microscopie electronică

IV.7.1. Principiul fizic al microscopiei electronice
IV.7.2. Interacţiunea unui fascicul de electroni cu preparatul
IV.7.3. Componentele principale ale microscopului electronic
IV.7.4. Microscopia electronică de transmisie
IV.7.5. Microscopia electronică cu baleiaj
IV.7.6. Tehnici în relaţie cu microscopia electronică



În microscopia optică, mărirea obiectului dezvăluie detalii care nu sunt vizibile cu ochiul liber. În microscopia electronică mărirea obiectului poate pune în evidenţă detalii care nu sunt vizibile nici cu ochiul liber nici la microscopul optic. a) Drosophila melanogaster, o insectă utilizată ca model de studiu; b)detalii ale capului musculiţei (microscopie optică); c)detalii ale ochiului insectei (microscopie electronică cu baleiaj) (Tobin, Morell, 107)

IV.7.1. Principiul fizic al microscopiei electronice

Dezvoltarea microscopiei electronice a pornit de la următoarele 2 argumente: **1)** necesitatea creşterii puterii de rezoluţie a microscopului optic, pentru a putea vizualiza molecule intracelulare foarte mici şi **2)** descoperirea comportamentului dual (corpuscul/undă) al electronilor. Primul microscop electronic a fost construit în 1932, de către ***Ernst Ruska*** *(Premiul Nobel pentru Fizică în 1986).*

1) După cum s-a discutat în capitolul precedent şi la lucrările practice, dacă pornim de la ecuaţia matematică a puterii de rezoluţie (P_r) a unui microscop, se observă că distanţa minimă rezolutivă *(d)* este o funcţie a lungimii de undă (λ) a sursei de lumină şi a aperturii numerice (*NA*) a lentilelor microscopului:

$$P_r = 1/d;\ d = \lambda/2nsinu,\ deci\ P_r = 2nsinu\ /\ \lambda$$

Se observă că o modalitate de a creşte puterea rezolutivă a microscopului (deci de a micşora *d*) poate fi scăderea ***lungimii de undă a radiaţiei utilizate.***

2) În 1923, ***Louis de Broglie*** a sugerat că elementele materiale pe care le-am privit dintotdeauna ca fiind doar particule ar putea avea, în mişcare, un caracter dual, prezentând şi proprietăţi de undă, în anumite situaţii. Aplicarea acestei ipoteze *(ipoteza lui de Broglie)* pentru electroni a constituit punctul de plecare al principiului microscopiei electronice. ***Louis de Broglie*** a stabilit o relaţie matematică care să permită calcularea lungimii de undă asociate, λ, a unei particule de masă m, care se deplasează cu viteza v:

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

(unde : h este constanta lui Planck)

Caracterul de *undă asociată electronului în mişcare* presupune că un fascicol de electroni poate fi, în mod asemănător unui fascicol de lumină în microscopia optică, reflectat şi focalizat pentru a forma o imagine. În 1927, experimentele lui ***Davisson*** şi ***Germer*** au condus la confirmarea caracterului de undă asociată electronilor în mişcare. Aceştia au observat că, la interacţiunea cu metalele, electronii erau împrăştiaţi diferit, cu deviaţie mai mare sau mai mică, în relaţie cu unghiul sub care interacţionau cu metalul, fenomen similar comportamentului unei raze de lumină la o suprafaţă de separare. Acest fapt sugera proprietăţi de undă asociate deplasării electronilor, lungimea de undă fiind corespunzătoare *relaţiei lui de Broglie*. Din *relaţia lui de Broglie* se mai observă că particulele cu masă mai mare (cum sunt şi protonii şi neutronii) vor avea lungimi de undă asociate mai mici şi vor fi mai greu de observat. De exemplu, lungimea de undă asociată unei mingi de baseball de 0,15kg aruncată cu o viteză de 40 m/sec ar fi:

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{6{,}6 \cdot 10^{-34} joule \cdot sec}{(0{,}15kg)(40m/sec)} = 1{,}1 \cdot 10^{-34} m$$

Dar pentru un electron cu viteza de $6x10^6$m/sec (obţinută prin accelerarea într-o diferenţă de potenţial de 100 volţi) lungimea de undă ar fi:

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{6{,}6 \cdot 10^{-34} joule \cdot sec}{(9{,}11 \cdot 10^{-31} g)(6 \cdot 10^{6} m/sec)} = 1{,}2 \cdot 10^{-10} m$$

adică 12 nm (pentru comparaţie, cea mai mică lungime de undă a luminii în spectrul vizibil este aprox. 39 000 nm).

Conform ecuaţiei precedente, dacă viteza de deplasare a electronului creşte, lungimea de undă asociată descreşte. Iar viteza electronului creşte (electronul este accelerat) dacă diferenţa de potenţial de accelerare creşte. Ca urmare, lungimea de undă asociată electronului va descreşte cu creşterea diferenţei de potenţial de accelerare a electronului (invers proporţional). De exemplu :

V (kV)	10	40	60	80	100
λ (pm)	13	6	5	4	3

BCU "M. EMINESCU" IAŞI
BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Pentru un dispozitiv care are rol de magnificare, în cazul de față un microscop, cel mai mic obiect care poate fi văzut clar ar fi comparabil în mărime cu lungimea de undă a radiației folosite pentru a obține imaginea. Limita teoretică de rezoluție a unui microscop electronic este de aproximativ 0,002 nm (pentru o lungime de undă a electronului de circa 0,004 nm). Ca urmare a aberațiilor lentilelor (observate și în cazul microscopului electronic ca și în cazul microscopului optic, a se vedea anterior, ***Capitolul IV.6.***) *limita de rezoluție este mai apropiată de valoarea 1-2 nm, ceea ce înseamnă de circa de $4x10^4$ ori mai mare decât puterea rezolutivă a unui microscop optic și de $2x10^6$ ori puterea rezolutivă a ochiului uman.* Deci, evident, microscopul electronic poate vizualiza detalii mult mai bine decât microscopul optic.

Mărirea la microscopul electronic este de până la 200 000 - 250 000 ori față de o mărire de până la 1000 ori la microscopul optic convențional. Unele microscoape electronice pot utiliza diferențe de potențial de accelerare foarte mari, de până la 10^6 V.

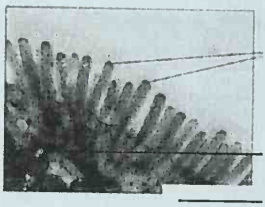


Figura IV.7.1.1. Vilozități intestinale – imagine în microscopie electronică prin transmisie – (107)

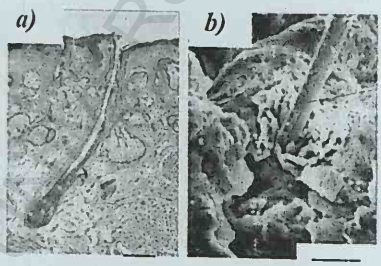


Figura IV.7.1.2. a) Secțiune prin piele – microscopie optică; b) Suprafața pielii văzută în microscopie electronică cu baleiaj (107)

În relație cu semnalul rezultat după interacțiunea electron – preparat, după cum se explică în cele ce urmează, examinarea în microscopie electronică poate furniza informații despre topografia, morfologia, compoziția preparatului studiat, precum și informații cristalografice.

Topografie: caracteristicile de suprafață ale unui obiect sau "cum arată", textura sa; relația directă între aceste caracteristici și proprietățile materialelor (duritate, reflexie ...- în special pentru probe anorganice, sau aranjarea moleculelor de suprafață din membrane, de exemplu - pentru cele biologice etc.)

Morfologia: forma și dimensiunea particulelor care alcătuiesc obiectul; relația directă între aceste structuri și proprietățile eșantionului studiat (conductivitate, rezistență, reactivitate - în special pentru probe anorganice, sau tip de structură conformațională a moleculelor componente, morfologie celulară sau intracelulară, de exemplu - pentru cele biologice etc.)

Compoziție: elementele componente ale obiectului și cantitățile relative ale acestora; relația directă între compoziție și proprietățile materialelor (punct de topire, reactivitate,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

duritate - în special pentru probe anorganice, sau fluditate, alte caracteristici membranare, de exemplu - pentru cele biologice etc.)

Informații cristalografice: modul în care atomii sunt aranjați în obiect; relația directă între aceste aranjamente și proprietățile materialelor (conductivitate, proprietăți electrice, rezistență - în special pentru probe anorganice, sau informații despre structura proteinelor, de exemplu - pentru cele biologice etc.).

IV.7.2. Interacţiunea unui fascicul de electroni cu preparatul

Când un fascicul de electroni cu o anumită energie întâlneşte un preparat se pot petrece mai multe fenomene.

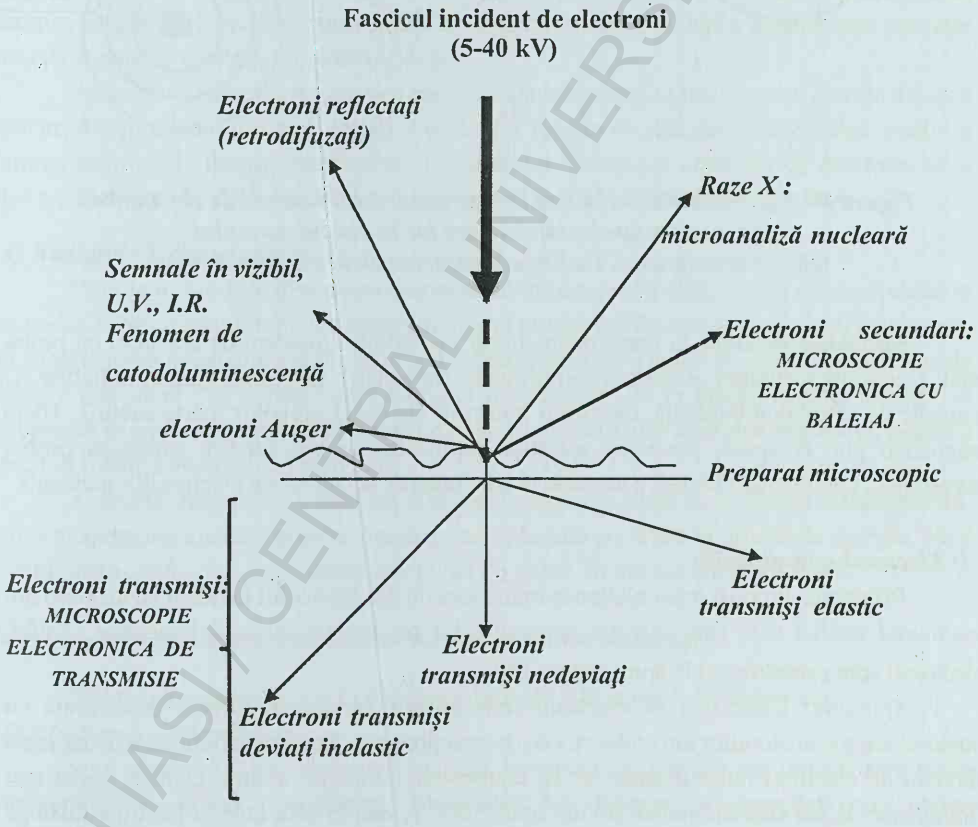


Figura IV.7.2.1. Reprezentare schematică a semnalelor rezultate la interacţia unui fascicul de electroni cu preparatul

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

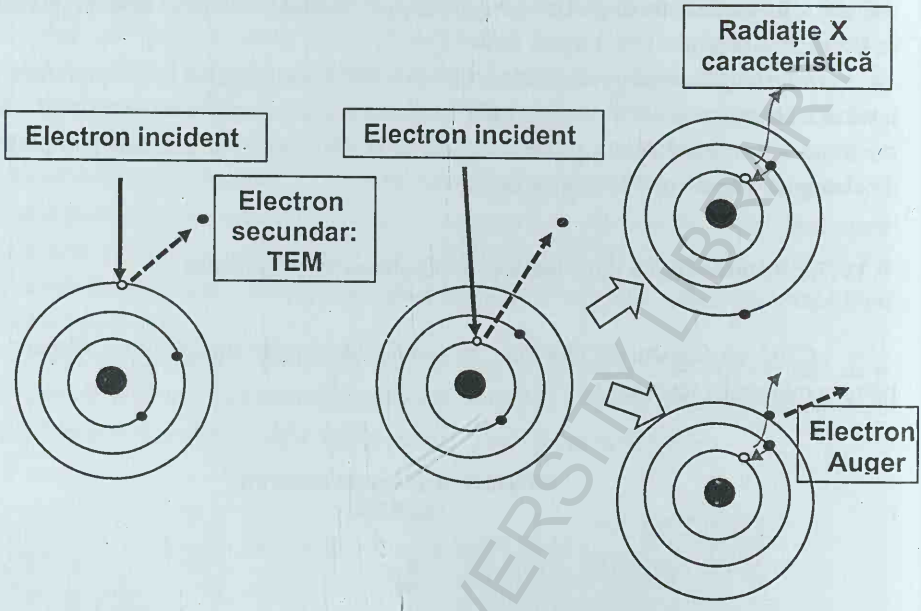


Figura IV.7.2.2. Semnale rezultate la interacţia unui fascicul de electroni cu preparatul: mecanismul care are loc la nivelul atomului (electroni secundari, Radiaţie X caracteristică, electron Auger)

Semnalele rezultate în urma interacţiunii fascicolului incident de electroni cu proba sunt: electronii secundari, electronii retrodifuzaţi (reflectaţi), electronii Auger, radiaţiile X, semnale de catodoluminiscenţă, electronii transmişi (în cazul probelor foarte subţiri). Toate semnalele pot să apară, ponderea acestora depinzând de trei factori: grosimea probei investigate, compoziţia chimică a acesteia şi tensiunea de accelerare a electronilor incidenţi.

1) Electroni retrodifuzaţi:

Principiu: Produşi prin coliziunea unui electron din fascicolul incident cu un atom din eşantionul studiat care este aproape perpendicular pe direcţia fasciculului incident. Astfel, electronii sunt retrodifuzaţi la aproximativ 180°.

Aplicaţie: Generarea de electroni retrodifuzaţi variază în directă dependenţă cu numărul atomic al atomilor din proba cu care interacţionează. Aceasta variabilitate în mărimea fluxului de electroni retrodifuzaţi face ca elementele cu număr atomic mare să apară mai 'luminoase' decât cele cu număr atomic mic. Acest principiu este utilizat pentru a distinge componentele probei care au diferite numere atomice.

2) Electroni secundari:

Principiu: Apar când traiectoria unui electron din fascicolul incident de electroni trece suficient de aproape de norul electronic al unui atom din suprafaţa preparatului microscopic, a.î. să cedeze o parte din energia sa unui electron din straturile superficiale ale atomilor cu

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

care interacționează, electron care va părăsi atomul pe o anumită traiectorie și cu o energie cinetică foarte mică (5eV). Acest electron rezultat din atomii preparatului microscopic se numește *electron secundar*. Fiecare electron incident poate produce câțiva electroni secundari.

Aplicație: Sunt utilizați în *microscopia electronică cu baleiaj*, producerea electronilor secundari fiind în directă relație cu topografia probei. Ca urmare a energiei foarte mici a acestora, 5 eV, numai electronii secundari produși din stratul superficial (<10 nm) pot părăsi preparatul și, apoi, pot fi înregistrați.

3) Electronii Auger

Principiu: Sunt generați prin dezexcitarea atomului din preparat după ce este emis un electron secundar de pe un strat intern. După ce un electron secundar de energie joasă a fost eliberat din atom, un orbital intern (energie mică) este disponibil și va primi un electron de pe un orbital extern (energie mai mare). Astfel, în economia energetică a atomului se creează un surplus, care poate fi rectificat prin emisia unui electron din orbitalurile externe care primește această cuantă de energie, un *electron Auger*.

Aplicație: Electronii Auger au o energie caracteristică fiecărui element atomic din care provin. Acești electroni sunt colectați si sortați in funcție de energia caracteristică pentru a furniza informații despre compoziția preparatului. Deoarece acest tip de electroni au o energie foarte mică, electronii detectați au originea la o adâncime de maxim 3 nm.

4) Radiațiile X caracteristice

Principiu: Produse prin dezexcitarea atomilor din probă după ce este emis un electron secundar de pe un strat intern. Deoarece, în timpul procesului de emisie secundară, un electron cu energie joasă a fost eliberat din atom, un orbital intern va fi nelocuit. Astfel, un electron de energie mai mare "va cobori" spre orbitalul intern liber, iar în timpul acestei tranziții se eliberează energie, în general sub forma de *raze X caracteristice* atomilor respectivi, pentru a restabili bilanțul energetic al atomului.

Aplicație: Razele X (asemenea fotonilor) emise din atom au o energie caracteristică, unică elementului din care provin. Acestea sunt colectate și sortate în funcție de energie, dând posibilitatea comparării caracteristicilor punct cu punct, în microanaliza nucleară.

Interacțiuni în preparatul/specimenul subțire: electroni transmiși

Electronii transmiși stau la baza microscopiei electronice de transmisie

5) Electronii neîmprăștiați

Sunt electronii din fascicolul incident transmiși prin proba examinată fără nicio interacțiune cu atomii constituenți. Transmisia de electroni neîmpraștiați este invers proporțională cu grosimea preparatului. Astfel, regiunile mai groase vor avea o luminozitate mai redusă, iar ariile mai subțiri o luminozitate mai accentuată.

6) Electronii împrăștiați (transmiși)elastic

Principiu: Sunt electronii din fascicolul incident deflectați de la traiectoria inițială de atomii preparatului într-o manieră elastică (fără pierdere de energie). Acești electroni sunt transmiși prin proba examinată pe traiectoria modificată.

Aplicaţie: Aceşti electroni se supun legii ***Bragg***. La fel cum electronii din fascicolul incident au aceeaşi energie (implicit, aceeaşi lungime de undă), toţi electronii împrăştaţi elastic care sunt deflectaţi de acelaşi plan atomic vor avea acelaşi unghi de împrăştiere, caracteristică exploatată prin colectarea lor de lentile magnetice şi dispunerea lor în pattern-uri de puncte; fiecare punct fiind specific unui anumit plan atomic. Din aceasta hartă a planurilor atomice se pot obţine informaţii despre orientarea şi configuraţia atomilor prezenţi în aria din preparat examinată.

7) Electroni împrăştiaţi (transmişi) inelastic:

Principiu: aceştia sunt electronii din fascicolul incident care interacţionează cu preparatul într-o manieră inelastică, cu cedare de energie în timpul interacţiunii. Ulterior, aceştia vor urma nouă traiectorie prin proba examinată.

Aplicaţie: Electronii transmişi inelastic reprezintă principiul fundamental al metodei de *Spectrometria de Pierdere de Energie a Electronilor*. Energia pierdută de electronii transmişi inelastic este caracteristică elementelor atomice cu care au interacţionat, aceasta fiind unică pentru fiecare legătură interatomică şi poate fi utilizată pentru a obţine informaţii atât despre *compoziţia* cât şi despre *tipul de legături chimice* din regiunea de preparat examinată.

IV.7.3. Componentele principale ale microscopului electronic

Părţile componente ale unui microscop electronic sunt similare unui microscop optic cu două diferenţe esenţiale: fascicolul de lumină (din microscopia optică) este înlocuit cu un fascicol de electroni (în microscopia electronică), iar, analog, lentilele optice sunt înlocuite cu "lentile" electromagnetice.

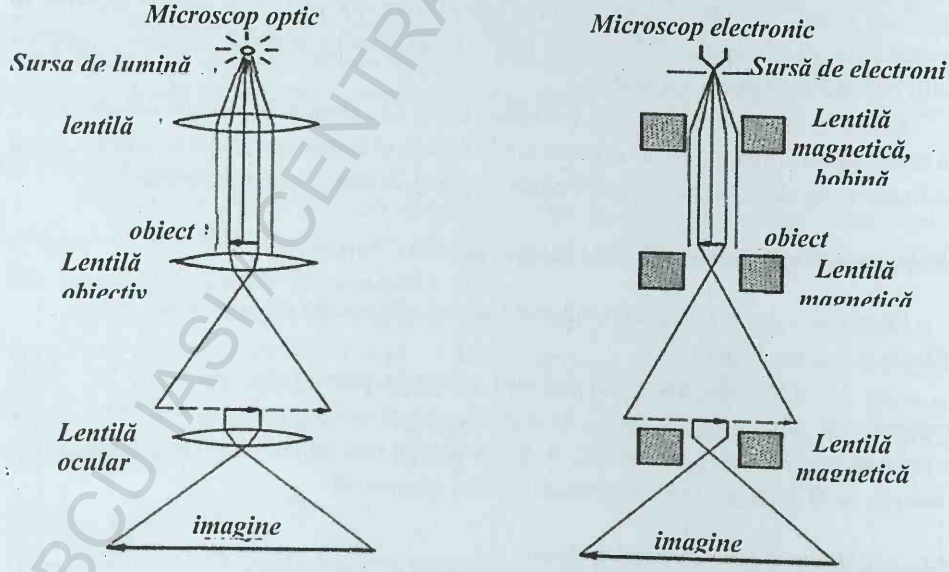


Figura IV. 7.3.1 Comparaţie între principiul fizic al microscopiei optice şi cel al microscopiei electronice (6)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Între diferitele tipuri de microscoape electronice există deosebiri între modalităţile de captare a imaginilor (după interacţiunea fascicul electronic - preparat); totuşi, elementele esenţiale ale microscopiei electronice (sursă de electroni, lentile convergente etc.) sunt aceleaşi, în mare parte.

Sursa de electroni este, în general, un filament de tungsten încălzit (la 2000°C), fiind atât sursă de electroni (*tun electronic*, prin emisie termionică) cât şi catod al microscopului. Există şi un anod, între cei doi electrozi aplicându-se o diferenţă de potenţial de până la 100 kV (de fapt până la 1 mV). Electronii emişi sunt monoenergetici.

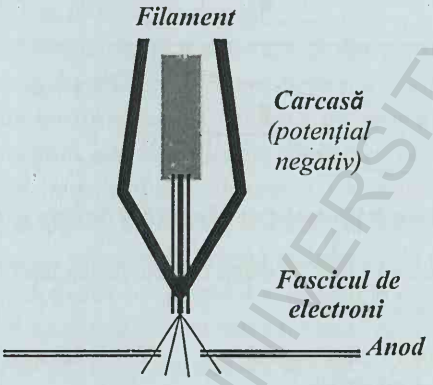


Figura IV.7.3.2. Sursa de electroni

Un *tun electronic cu emisie termionică* funcţionează în modul următor:

- se aplică un potenţial electric pozitiv la anod
- filamentul (catod) este încălzit până ce începe emisia unui flux de electroni
- apoi, electronii sunt accelerați de potenţialul electric pozitiv de-a lungul coloanei
- se aplică un potenţial electric negativ (~500 V) pe carcasa filamentului
- pe măsură ce electronii migrează către anod, orice electron emis de la nivelul filamentului spre lateral este respins de carcasa încărcată negativ, către axul optic
- se formează o colecţie de electroni în spaţiul dintre vârful filamentului şi manşonul negativ (*spaţiu încărcat*)
- electronii de la baza *spaţiului încărcat* (cei mai apropiați de anod) pot ieşi din tunul electronic prin orificiul mic (<1 mm) al carcasei
- aceşti electroni vor migra de-a lungul coloanei pentru a fi utilizaţi, ulterior, în formarea imaginilor. Migrarea electronilor se realizează în vid.

Suportul preparatului trebuie să fie foarte subţire, construit special pentru microscopie electronică. Dacă electronii pierd prea multă energie (în cazul TEM) distanţa de convergenta a lentilelor următorului obiectiv se va schimba şi va induce o aberaţie similară aberaţiei cromatice din microscopia optică. Ca şi suport, pot fi utilizate straturi extrem de subţiri (1-10 nm) alcătuite din atomi cu număr atomic mic (de exemplu, oxid de aluminiu sau carbon) montate în grilaje împletite fin din cupru. Deşi un astfel de suport este foarte subţire în comparaţie cu lama de sticlă din microscopia optică, la rezoluţii mari, acesta

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

poate fi o sursa de artefacte ale imaginii preparatului. Mai pot fi utilizate şi secţiuni foarte fine din probă de examinat (<10 nm) incluse in răşini, fără suport.

Lentilele pot fi bobine magnetice încapsulate sau lentile electrostatice. Cele de tip electrostatic presupun acţiunea unui câmp electric asupra unui flux de electroni. Într-un câmp electric cu intensitatea E, electronul încărcat va avea forţa $F = eE$. Dacă electronul se deplasează, acesta va fi deviat cu un unghi α spre polul pozitiv. Acest unghi va fi direct proporţional cu intensitatea campului electric, *E*.

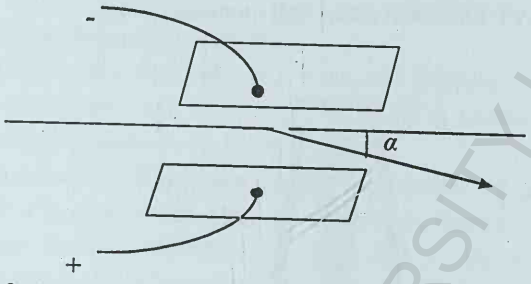


Fig. IV. 7.3.3. Devierea traiectoriei unui electron într-un câmp electric

Configuraţii specifice a liniilor de câmp electric fac ca fasciculul de electroni să aibă traiectorie convergentă sau divergentă.

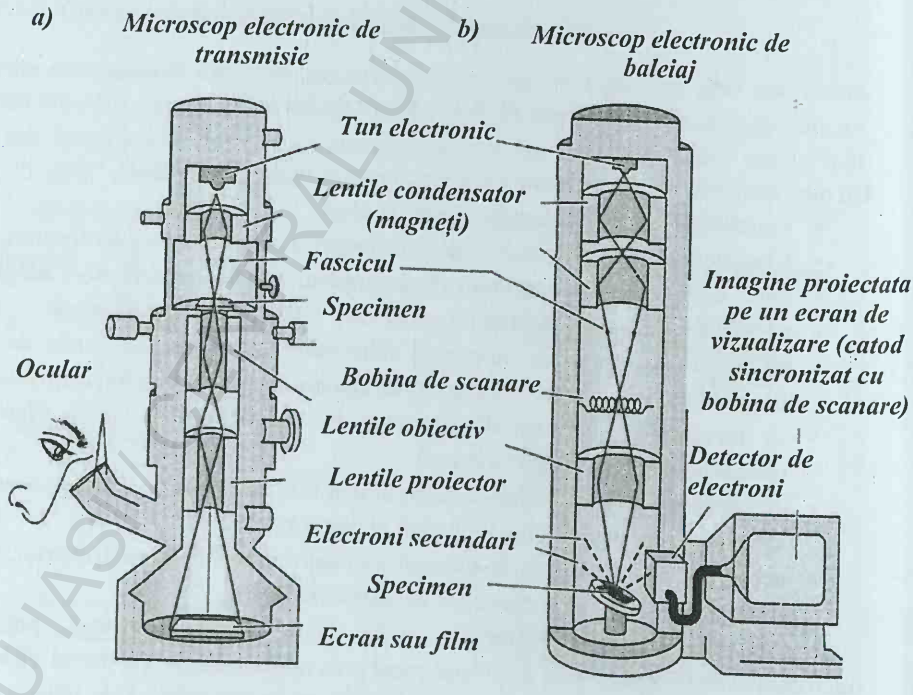


Figura IV.7.3.4. Componentele microscopului electronic (107)

Cel mai simplu model de lentile electrostatice este reprezentat de un inel metalic, încărcat negativ: electronii care trec exact prin axul central nu vor fi deviaţi; în schimb, toţi

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ceilalţi vor fi deviaţi către centru, similar unei lentile optice convergente.

Totodată, şi câmpurile magnetice pot devia traiectoria electronilor, cel mai simplu exemplu fiind un conductor circular, prin care circulă un curent electric, care va determina apariţia unui câmp magnetic asociat.

Mărirea γ va fi:

$$\gamma = \frac{A''B''}{AB} = \frac{A''B''}{A'B'} \times \frac{A'B'}{AB} = \gamma_1\gamma_2$$

γ_1 şi γ_2 sunt parametrii de mărire ai lentilei obiectiv, respectiv lentilei proiector. γ poate avea valori de până la 100,000, de regulă.

Funcţionarea microscopului electronic rezultă din părţile lui constitutive. Astfel, diferenţa de voltaj dintre catod şi anod accelerează electronii emişi de filamentul de tungsten, şi-i dirijează prin coloana microscopului. Câmpurile magnetice sunt instalate de-a lungul traiectoriei fluxului de electroni, servind ca lentile condensor, obiectiv şi proiector. Suportul pentru preparat este situat între lentila condensor şi cea obiectiv. În timp ce proba este bombardată cu fluxul de electroni, unii dintre electroni sunt deflectaţi de probă, în timp ce alţii sunt transmişi. Electronii transmişi formează imaginea prin focalizarea lor pe un ecran flourescent, care prin interacţiunea cu electronii accelerați la viteze mari, vor emite lumină în spectru vizibil, formând o imagine care va putea fi văzută de ochiul nostru. Imaginea poate fi, de asemenea, înregistrată pe film fotografic sau stocată pe computer, pentru a fi analizată în detaliu. Dacă electronii ar circula în aer s-ar produce deflexiunea, elastic sau nu, a acestora prin coliziunea cu moleculele din aer. Ca urmare, trebuie să circule în vid. Astfel, microscopul are încorporate pompe de vid, iar înainte de crearea fasciculului de electroni, aerul trebuie să fie complet evacuat din incinta microscopului.

În funcţie de lungimea de undă a radiaţiei produse de interacţiunea dintre preparat şi fluxul de electroni incidenţi, s-au dezvoltat două tipuri principale de microscopie electronică: ***microscopia electronică de transmisie clasică (TEM)*** şi ***microscopia electronică de baleiaj (SEM)***; există şi tehnici de microscopie electronică combinată, de exemplu *microanaliza nucleară, microscopia electronică cu emisie fotoelectrică* etc.

IV.7.4. Microscopia electronică de transmisie (Transmission Electronic Microscopy - TEM)

Microscopia electronică de transmisie are la bază obţinerea imaginilor preparatului prin colectarea electronilor transmişi printr-o secţiune din acesta.

Principalele componente ale unui microscop electronic de transmisie clasic sunt (**Figura IV.7.3.4.**, toate în vid la 10^{-5} torr):

- sursa de electroni (produce un flux monocromatic de electroni)
- lentilele condensor (pentru obţinerea unui fascicul paralel de electroni); fasciculul este îngustat prin apertura condensorului (ajustabilă, de obicei, de către utilizator), îndepărtând electronii aflaţi la un unghi prea mare în raport cu axul optic ; dar în momentul interacţiunii cu preparatul, electronii vor interacţiona cu întregul câmp microscopic în

același timp (așa cum lumina traversează tot preparatul la un microscop optic)

- suportul cu preparatul; fasciculul de electroni întâlnește proba de examinat, iar o parte din el este transmis

- lentilele obiectiv, cu distanța focală mica, generează o imagine intermediară *A'B'*, reală, mai mare și inversată

- planul imaginii mărite

- o lentilă de proiecție, prin care se creează pe ultimul ecran o imagine finală, mai mare, *A"B"*

- ecranul (imaginea finală mărită): fluxul de electroni transmiși întâlnește ecranul din fosfor și este emisă lumină, cu arii mai închise sau mai deschise, în funcție de gradul de împrăștiere al electronilor la nivelul preparatului. Regiunile mai întunecate ale imaginii corespund unor arii din probă cu transmisie mai redusă de electroni (mai groase sau mai dense). Regiunile mai luminoase corespund ariilor din probă cu transmisie mai mare de electroni (mai subțiri sau mai puțin dense).

TEM este construit după patternul microscopului optic convențional și permit obținerea unor informații similare, despre morfologia, în plus aranjamentul atomilor și compoziția probelor, rezoluția fiind mult mai mare.

Informații morfologice: dimensiunea, formă, și configurația particulelor din care este alcătuit preparatul, cât și interacțiunea dintre acestea, la scară atomică.

Informații cristalografice: aranjamentul atomilor din preparat și gradul lor de ordine, identificarea de defecte la scară atomică în regiuni de ordinul nanometrilor.

Informații despre compoziție (în relație cu tehnica utilizată): elementele și compușii din care este alcătuită proba studiată.

IV.7.5. Microscopia electronică de baleiaj (Scanning Electron Microscopy -SEM)

Microscopia electronică de baleiaj este o tehnică de examinare a suprafețelor și detaliilor preparatului de examinat. Un fascicol de electroni scanează pentru un interval scurt de timp suprafața probei, punct cu punct. Electronii incidenți determină emiterea de electroni secundari de pe suprafața preparatului. Acești electroni secundari vor fi colectați de un detector și proiectați pe un monitor ca imagine (analog televizorului). Pentru a evita interferența cu efectele electrostatice a suprafețelor non-conductive (probele biologice), o secțiune din preparat fixată este tapetată cu un film subțire de atomi de metale grele (suprafața preparatului este vaporizată cu un strat subțire conductor). Apoi, secțiunea este scanată cu un fascicol de electroni cu focalizare precisă, iar electronii deflectati de suprafața învelită în metale sunt colectați de un detector de electroni și afișați ca o imagine tridimensională pe monitor.

Detaliile morfologice ale preparatului reflectă electronii în diferite moduri, și sunt obținute semnale electrice proporționale cu fluxul de electroni reflectați, aceste semnale modulând intensitatea fascicolului de electroni de pe monitor. Microscopia electronică de baleiaj oferă posibilitatea explorării caracteristicilor de suprafață celulară, cu o rezoluție modestă față de TEM (5-10 nm). Dar, deși rezoluția este mai mică, imaginile au suficient contrast pentru a vizualiza detaliile suprafețelor examinate.

Microscopia electronică de baleiaj (SEM) oferă informații despre:

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Topografie: caracteristicile de suprafață ale preparatului, cu detalii limitate la câțiva nanometri.

Morfologie: forma, dimensiunea și aranjamentul elementelor din care este alcătuită suprafața preparatului sau expuse prin răzuire sau corodare chimică.

Compoziție: elementele și compușii din care este alcătuită proba examinată și raporturile relative dintre constituienti, în regiuni de aprox. 1 um în diametru. Informații cristalografice: configurația atomilor din probă și nivelul lor de organizare; util doar în contextul unor particule de cristal >20 μm.

Modul de funcționare al unui SEM este după cum urmează:

- tunul de electroni produce un flux de electroni monocromatici
- fluxul este îngustat de lentilele condensor. Aceste lentile au un dublu rol, atât de generare a fascicolului de electroni cât și de îngustare a fluxului de electroni din fascicul. Această proprietate este în sinergie cu apertura condensorului pentru a elimina electronii cu unghi de incidență prea deviat în raport cu axul optic
- fasciculul este ulterior îngustat de apertura condensorului
- o a 2-a lentilă condensor modelează fluxul de electroni într-un fascicul, subțire, compact și coerent
- o apertură ajustabilă asociată obiectivului elimină și mai mult din electronii incidenți deviați
- un set de bobine "scanează", deplasează, fasciculul într-un tipar grilă (analog televizorului), timpul de scanare în dreptul fiecărui punct fiind dependent de viteza de scanare (în general, în intervale de microsecunde)
- o ultimă lentilă, obiectivul, focalizează fasciculul de scanare pe regiunile de interes din preparat.

În momentul în care fasciculul întâlnește suprafața preparatului (cu latență de câteva microsecunde) interacțiunile care apar în interiorul preparatului sunt detectate de diverse tipuri de instrumente, în relație cu metoda aleasă. Înainte ca fasciculul să se deplaseze în următorul punct, aceste instrumente măsoară numărul de interacțiuni și afișează un pixel pe un ecran CRT, a cărui intensitate va fi în directă relație cu acest număr (cu cât este mai mare, cu atât crește și luminozitatea pixelului). Acest proces este reiterat până când scanarea în grilă este încheiată și apoi este reluat, întreaga grilă putând fi scanată de 30 de ori pe secundă.

IV.7.6. Tehnici în relație cu microscopia electronică

Microanaliza nucleară (cu raze X)

Aceasta este o tehnică derivată din microscopia electronică cu baleiaj care permite obținerea de informații despre compoziția preparatului de studiat. Semnalul fizic care stă la baza principiului microanalizei nucleare este reprezentat de razele X caracteristice.

La interacția unui fascicul îngust (sub un micrometru) de electroni cu un eșantion de studiat, fiecare element chimic produce radiații X cu o lungime de undă caracteristică elementului, conform *legii Moseley*. Aceasta este, prin urmare, legea de principiu care permite calculul frecvenței radiației X caracteristice atomului la nivelul căruia s-a realizat interacțiunea. Cu ajutorul unui spectrometru de radiații X se poate obține spectrul lungimilor

de undă a radiaţiilor X caracteristice emise şi se poate afla, deci, natura chimică a elementelor prezente. Expresia matematică a *legii Moseley* este redată mai jos:

$$\nu_{kn} = R(Z-\sigma)^2\left(\frac{1}{n^2}-\frac{1}{k^2}\right)$$

unde:

- ν_{kn} – *frecventa radiatiei X emise de atom la tranziţia k-n*
- *Z - numărul atomic al elementului*
- *(n,k) - numerele cuantice principale ale nivelurilor între care are loc tranziţia*
- *R şi* σ *- 2 constante (Riedberg - R, constantă de ecran -* σ*)*

Această lege stabileşte, după cum se observă, că frecvenţa radiaţiei X caracteristice este dependentă de orbitalele *n* şi *k* între care are loc tranziţia, de natura elementului (numărul atomic *Z*) şi de 2 constante: o constantă de ecran, σ, şi constanta Riedberg, *R*.

Razele X caracteristice sunt detectate cu ajutorul unui spectrometru de raze X, care este cuplat la un microscop electronic de baleiaj. Fiecare maxim al spectrului reprezintă o tranziţie între două orbitale electronice cu o energie caracteristică – fiecare element are "amprenta" dată de un pattern specific de maxime, astfel că poate fi dedusă identitatea elementelor prezente în preparat.

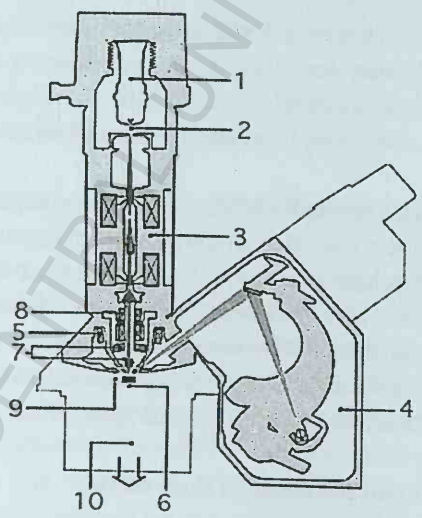


Figura IV.7.6.1. Reprezentare schematică a metodei de microanaliză nucleară
(1 – tun electronic, 2 – anod, 3 – lentila condensor, 4 –spectrometru cu raze X, 5 – lentila objectiv, 6 – preparat, 10 – sistem vacuum (vid).

Prin definirea spectrului de raze X caracteristice ale preparatului se poate determina, calitativ şi cantitativ, compoziţia chimică a preparatului examinat. Pot fi calculate concentraţii în valori absolute ale elementelor individuale prin analiză comparativă cu spectrele altor preparate a căror compoziţie a fost determinată (spectru de referinţă). Tehnica are aplicabilitate vastă, de la cercetare în biologie şi medicină până la cercetare în paleontologie şi analiza compoziţiei meteoriţilor.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.8. Difracția cu raze X

Difracția cu raze X (cunoscută și sub numele de cristalografia cu raze X) este o metodă de analiză ce poate fi folosită în studiul structurilor ordonate, fiind utilizată pentru studiul segmentelor ordonate ale unor macromolecule. Este esențială îndeosebi pentru înțelegerea structurii conformaționale a proteinelor.

Agentul fizic utilizat în această metodă este reprezentat de radiațiile X. Acestea sunt unde electromagnetice ce au o lungime de undă situate, cu aproximație, în domeniul angstromilor (10^{-10} m), deci mult mai scurtă decât lungimea de undă a luminii.

Producerea radiațiilor X

Într-un tub cu raze X conventional, electronii sunt emiși termionic dintr-un filament încălzit la temperaturi înalte și sunt accelerați, printr-o diferență de potential înaltă, către o țintă metalică (anodul). În urma ciocnirii dintre electron și anod, electronii decelerează rapid, surplusul de energie dând posibilitatea producerii razelor X. Aproximativ 99% din energia electronilor intră în producerea de căldură. Ținta poate fi repezentată de un metal cu punct înalt de topire, un metal greu (deobicei tungsten) încorporat într-o tijă de cupru astfel încât căldura să fie îndepărtată de țintă.

Când un electron lovește un anod se produc două fenomene esențiale:

- Ciocnește atomii și este încetinit, generând radiații cu distribuție continuă a lungimilor de undă ('bremstrahlung') ;

- Provoacă tranziții atomice, ceea ce determină apariția de raze X cu lungimi de undă bine definite.

Spectrul radiațiilor X va avea două componente distincte :

- O radiație continuă, de fond, a cărui lungime de undă minimă depinde de tensiunea de funcționare a tubului, adică de energia electronilor bombardanți.

- O emisie intensă a câtorva lungimi de undă (spectru liniar de radiații X). Aceste lungimi de undă sunt caracteristice materialului țintă și sunt independente de tensiunea de funcționare.

Radiația de fond (bremstrahlung) este obținută, asa cum am precizat mai sus, prin ciocnirea electronilor cu ținta și decelerarea acestora. Energia din cuantele de raze X emise este egală cu energia pierdută în decelerare. Un electron poate pierde orice fracție din energia sa prin acest proces. Cele mai energice raze X (adică cele ale căror lungime de undă este λ_{min}) sunt rezultatul bombardării electronilor care își pierd toată energia imediat. Din moment ce energia electronilor depinde de tensiunea de funcționare, la fel depinde și λ_{min}. Razele X cu lungimi de undă mai mici sunt rezultatul pierderii incomplete de energie a electronilor.

Spectrul de linii este rezultatul tranziției electronilor din atomii materialului țintă. Electronii care bombardează ținta au o energie mare (~100KeV) și sunt capabili să deplaseze electronii de pe straturile energetice mai adânci ale atomilor materialului țintă. Aceasta înseamnă înlăturarea unui electron de pe un strat intern. Ca urmare, un electron de

pe un strat exterior (care are, deci, o energie mai mare) 'cade' în această poziție liberă, iar diferența de energie va fi eliberată din atom sub forma unei radiații X.

Lungimea de undă a radiației X este dată de relația :

$$E=hc/\lambda,$$

unde : E este diferența de energie a straturilor implicate, c reprezintă viteza luminii și h este constanta Planck

Deoarece nivelurile de energie sunt caracteristice atomilor din materialul țintă, la fel este și lungimea de undă a razelor X produse în acest fel.

Diferența esențială dintre tranzițiile care dau naștere razelor X și cele care produc cuante de lumină este că tranzițiile generatoare de raze X implică nivele energetice adânci, iar tranziția optică nu.

Principiul difracției razelor X

Atunci când undele electromagnetice interacționează cu o structură ordonată, distribuția zonelor regulate crează, practic, o rețea de difracție și, dacă distanța dintre punctele de difracție este de același ordin de mărime ca lungimea de undă, un fenomen de difracție se va observa, cu producerea unui patern de difracție. Astfel, în cazul razelor X, dacă acestea interacționează cu un cristal (o matrice ordonată a unei unități structurale), va avea loc fenomenul de împrăștiere, pe centrele de dispersie (reprezentate de atomii materialului, punctele de difracție din cristal).

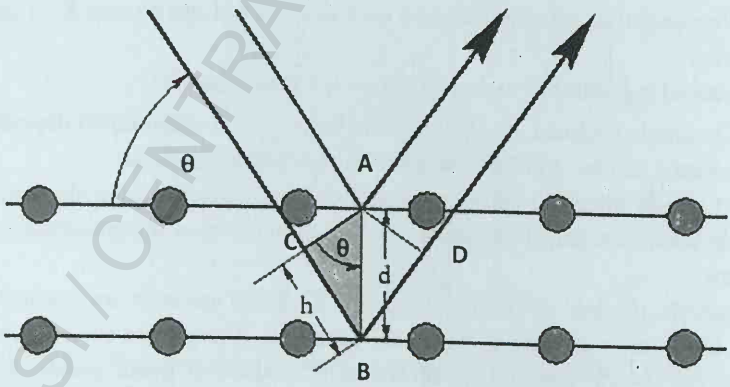


Figura IV.8.1. Diagrama metodei difracției cu raze X

W.H. Bragg (1862-1942) și fiul său ***W.L. Bragg (1890-1971)*** au studiat acest fenomen și au demonstrat că razele X împrăștiate pot fi văzute pe masură ce sunt reflectate de planurile din care este alcătuit cristalul, aceste planuri fiind formate din unități de împrăștiere (atomi), așa cum e prezentat în ***Figura IV.8.1.***

Din această figură rezultă că diferența de drum dintre raza incidentă și raza reflectată este *(BC + BD)* .

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru a avea puncte de maxime de difracție, diferența de drum trebuie să fie un număr întreg, n, de lungimi de undă, λ:

$$BC + BD = n\lambda$$

dar:

$$BC = BD = AB \cdot sin\theta = d \cdot sin\theta$$

ca urmare:

$$\mathbf{2}d sin\theta = n\lambda$$

Aceasta relație se numește ***ecuația Bragg,*** și oferă condiția de maxime de difracție (intensitatea maximă -puncte - a undelor reflectate). Se observă că aceste maxime de difracție depind, în afară de lungimea de undă a radiației, λ, de distanța, d, dintre planurile pe care are loc fenomenul și de unghiul, θ , sub care interacționează radiațiile X cu structura studiată. Singurul parametru care poate fi modificat este, deci, unghiul, θ .

Figura IV.8.2. W. H Bragg și W. L. Bragg pe ștampila poștală suedeză. Cei doi au primit premiul Nobel pentru Fizică în 1915 pentru "faimoasa ecuație"

Difracția cu raze X oferă posibilitatea de a determina următoarele caracteristici ale structurilor:

- Pentru o structură cunoscută, aranjarea ordonată, *pattern*-ul poate fi calculat cu exactitate.
- *Simetria* pattern-ului de difracție, dată de simetria rețelei.
- *Intensitatea* punctelor, determinată de natura atomică a fiecărui punct de pe rețea.
- *Claritatea* și forma punctelor determinate de perfecțiunea cristalului.
- Componenta de lichid, sticlă și alte materiale dezordonate, care generează *inele fuzzy largi* în loc de puncte clare.
- *Defectele și modificările din cristal pot duce la dispersie difuză.*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

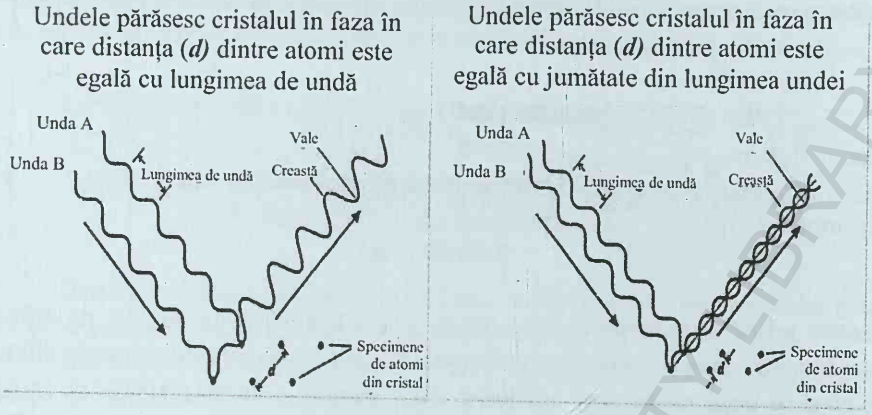

Undele părăsesc cristalul în faza în care distanța (d) dintre atomi este egală cu lungimea de undă
Unda A
Unda B
Lungimea de undă
Vale
Creastă
Specimene de atomi din cristal
Undele părăsesc cristalul în faza în care distanța (d) dintre atomi este egală cu jumătate din lungimea undei
Unda A
Unda B
Lungimea de undă
Vale
Creastă
Specimene de atomi din cristal

Figura IV.8.3. Difracția razelor X: punctele de reflexie maxime și minime (107).
Pentru anumite unghiuri θ se vor obține maxime de difracție (puncte vizibile pe difractogramă). Se observă că, în ecuația Bragg, singura necunoscută va rămâne distanța d care va putea fi, astfel, determinată.

Există două tipuri de metode de cristalografie cu raze X:

a) **Pe cristale:** Proba de cristal este rotită încet și, astfel, unghiul θ se schimbă; numai pentru anumite unghiuri *ecuația Bragg* este realizată și punctele de reflexie ***Bragg*** (intensitate maximă) vor fi înregistrate pe film fotografic.

Un cristal tridimensional real conține mai multe planuri. Pentru difracție, cristalul trebuie să aibă orientarea corectă față de fasciculul de intrare.

Una dintre problemele acestei metode este că nu poate fi observat un singur cristal; de asemenea, orientarea cristalului este dificilă și necesită timp. Dacă în probă este prezentă mai mult de o fază, poate fi dificil să se realizeze că există mai multe seturi de reflecții.

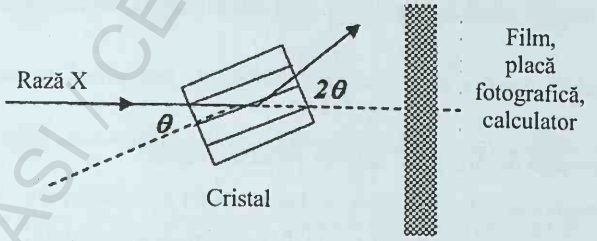


Figura IV.8.4. Schema de înregistrare a paternului de difracție a razelor X din cristal

b) **Pe pulbere:** în acest caz proba este pulverizată într-o incintă, goală și închisă, astfel încât razele X incidente vor interacționa cu particulele în toate unghiurile θ posibile; pentru anumite unghiuri ecuația Bragg este realizată și punctele de reflexie Bragg vor fi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

înregistrate pe ecranul sau filmul fotografic. De obicei este mult mai ușoară prepararea unei probe sub formă de pulbere. Proba este formată, practic, dintr-o colecție de mai multe cristale mici, cu orientări aleatorii. Acest tip de metodă garantează obținerea tuturor razelor reflectate și reprezintă cea mai bună metodă de a urmări schimbările de fază în funcție de temperatură, presiune sau alte variabile.

Difracția razelor X este obținută în dispozitive numite *difractometre*, o diagramă simplificată a principiului de funcționare a acestora fiind reprezentată în figura următoare:

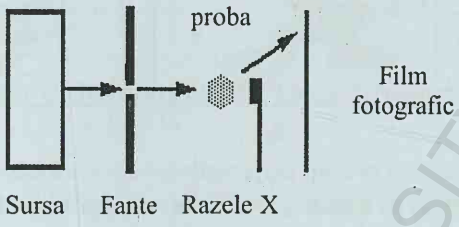


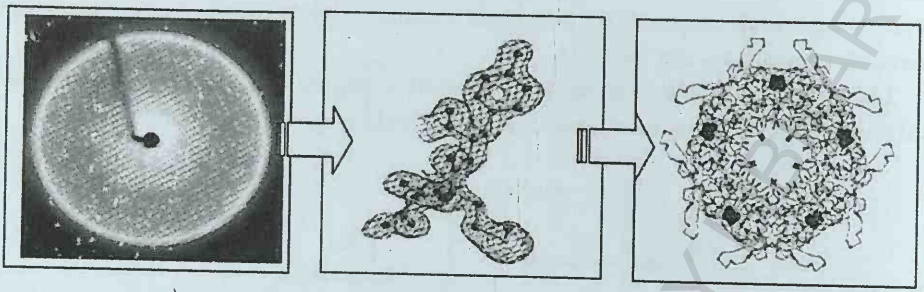
Figura IV.8.5. Principiul difracției cu raze X (52)

Cristalografia cu raze X a permis elucidarea structurii proteinelor, regiunile regulate de la nivelul proteinelor fiind, de fapt, rețele naturale de difracție a razelor X. Rezoluția metodei poate fi de aproximativ 5-6 Å. De asemenea, s-a demonstrat că o proteină poate avea regiuni regulate cu structuri secundare diferite (alfa sau beta), dar și regiuni cu structuri neregulate. Înregistrând rezultatele analizei pe computer, imagini ale fiecarei secțiuni sunt transmise către computer și se realizează o reconstrucție tridimensională, oferind, astfel, *modelul structurii conformaționale a proteinei* în segmentele sale obișnuite.

Figure IV.8.6. Difractograma pentru colagen (a) și pattern-ul de difracție a unui cristal tetragonal de lizozim (b) –(130)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru a studia structura proteinei utilizând razele X trebuie urmați câțiva pași:



a) *b)* *c)*

Figura IV.8.7. Etape în studiul proteinelor prin difracție cu raze X (explicația în text) – (129)

a. În prima etapă, proteina trebuie pregătită sub formă de *cristale* sau *pulberi*.
b. Se realizează *difractograma cu raze X*
c. Cu ajutorul computerului, se realizează *harta de densitate electronică a proteinei*
d. Computerul realizează *modelul structural conformațional al proteinei*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV.9. Tehnici spectroscopice cu utilitate medicală: elemente esențiale

IV.9.1. Principiul și clasificarea tehnicilor spectroscopice
IV.9.2. Spectre de tranziție electronică
IV.9.3. Spectrometrie de microunde (spectre de rotație)
IV.9.4. Spectromeria în infraroșu și Raman (spectre de vibrație-rotație)

IV.9.1. Principiul fizic și clasificarea tehnicilor spectroscopice

Tehnicile de spectroscopie/spectrometrie intră în categoria metodelor de analiză.

Când o undă electromagnetică interacționează cu un material (care știm că este alcătuit din molecule, formate din atomi, formați, la rândul lor, din nucleu și înveliș electronic), apare transferul unei cuante de energie, în baza *Legii conservării energiei*. În urma acestui fenomen de tranziție de energie rezultă un spectru care include toate radiațiile emise și care este caracteristic pentru fiecare substanță care a fost implicată în transferul energetic. În funcție de cantitatea de energie transferată și de proprietățile substanțelor, au loc diferite fenomene fizice, caracterizate prin spectre corespunzătoare de frecvențe, respectiv lungimi de undă. Următorul tabel prezintă o enumerare a tipurilor de spectre în relație cu cantitatea de energie transferată și cu tipul de fenomen structural implicat.

Tabel IV.9.1.1. Tipuri de spectre în relație cu cantitatea de energie transferată și cu tipul de fenomen structural apărut la interacția radiației electromagnetice cu materia

Fenomen	*Domeniu spectral*	*Lungime de undă*
Nuclear	Gamma	0,1 nm
Electroni situați pe pătura interioară	Raze X	0,1-1,0 nm
Ionizare	Ultraviolet (UV)	0-200 nm
Electroni periferici (de valență)	Ultraviolet apropiat și Vizibil	200-800 nm
Rotația și orientarea spinului electronic în câmp magnetic	Microunde	400 μm – 30 cm
Orientarea spinului nuclear în câmp magnetic	Unde Radio	> 100 cm

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnicile spectroscopice *(skopéō = a vedea)* se referă la metodele de studiu ale unor spectre apărute în urma interacției radiațiilor electromagnetice cu substanța și se referă, conform etimologiei, în principal la punerea în evidență și observarea spectrelor (rezultat calitativ). Aceste spectre, fiind caracteristice substanțelor care le produc, pot permite identificarea acestor substanțe. Termenul de *spectrometrie* este de obicei folosit în loc de *spectroscopie* cînd intensitățile semnalelor de la diferite lungimi de undă sunt măsurate și tehnica are rezultate cantitative. Denumirea este completată în relație cu principiul de bază și cu tipul de radiație utilizat.

În cazul spectroscopiei în domeniul vizibil, dispozitivul utilizat pentru a observa și a analiza spectrul (primește lumina, o împarte in lungimi de undă componente, detectează spectrul de absorbție sau emisie) poartă numele, în general, de spectroscop (când exprimă calitativ prezența spectrului) sau spectrometru (când permite o analiză cantitativă). Acest tip de spectroscopie este exemplificat la lucrările practice.

În general toate dispozitivele utilizate pentru a exprima calitativ prezența spectrului prezintă următoarele elemente principale:

- o sursă de lumină (sau altă radiație electromagnetică),
- un element care separă lumina în lungimi de undă componente (de obicei prismă),
- un detector pentru a observa prezența spectrului rezultat.

Prismele de sticlă au fost primele dispozitive utilizate pentru a dispersa lumina albă (radiație policromatică) în radiațiile (culorile) sale componente (fascicule monoenergetice /monocromatice, cu lungimi de undă caracteristice).

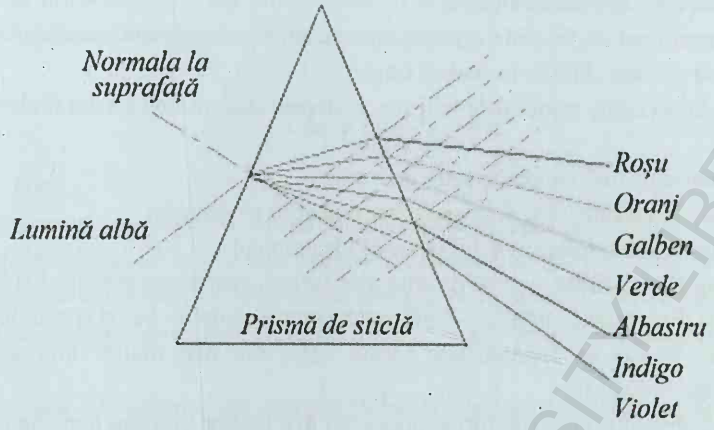
Drumul unei raze de lumină monocromatice este deviat (refractat) când trece dintr-un mediu transparent în altul, de exemplu din aer în sticlă. Diversele culori (lungimi de undă) ale luminii sunt refractate sub diferite unghiuri; prin urmare o rază părăsește prisma într-o direcție care depinde de lungimea de undă asociată culorii corespondente.

După cum se poate observa, termenul *dispersie* nu este sinonim cu termenul *refracție* (figura IV.9.1.1.).

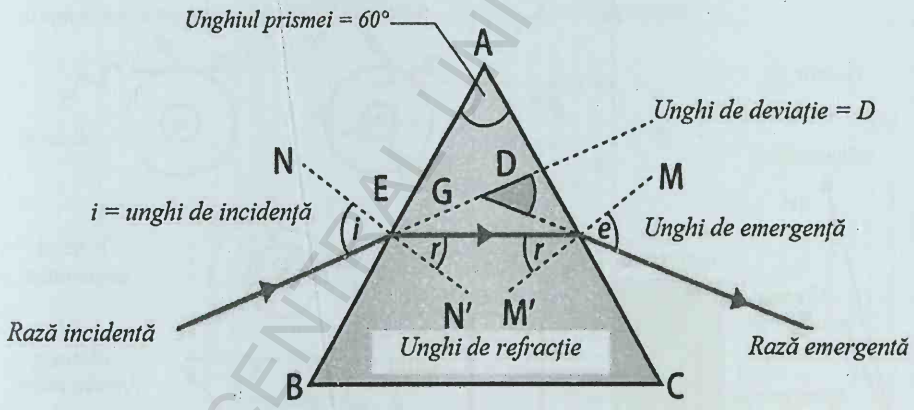
Unghiul cu care fiecare rază monoenergetică este deviată la interfața dintre două medii poate fi calculat utilizând legea ***Snell***. Legea lui ***Snell*** afirmă că, dacă n_1 și n_2 sunt, respectiv, indicii de refracție pentru două medii diferite, *1* și *2*, din afara prismei respectiv al prismei în sine, iar i și r sunt unghiurile dintre lumina incidentă/refractată și normala la interfața dintre cele două medii atunci ecuația $n_1 \sin i = n_2 \sin r$ este adevărată pentru toate razele monoenergetice. Indicele de refracție al mediului, indicat de simbolul n, este definit ca fiind raportul dintre viteza luminii în vid și viteza luminii în mediul respectiv.

Deoarece indicele de refracție al sticlei optice variază într-un procent mic de-a lungul spectrului vizibil, diferitele lungimi de undă rezultate în cazul dispersiei luminii albe sunt separate de un unghi mic.

BCU "IOAN SLAVICI" TIMIȘOARA UNIVERSITY LIBRARY



a) Dispersia luminii albe prin prisma optică



b) Refracția unei radiații monocromatice prin prisma optică

Figura IV.9.1.1. Dispersia luminii albe (a) versus Refracția unei radiații monocromatice (b) prin prismă

O clasificare a spectrelor se poate face și în relație cu fenomenul implicat în generarea spectrului. O moleculă organică poate cumula diferite cantități de energie; în funcție de cantitatea de energie transferată, pot avea loc diferite tipuri de procese moleculare, energia utilizată fiind numită în relație cu procesul implicat:

- energie de translație
- energie de rotație

UMF IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- energie de vibrație a atomului
- energie de tranziție electronică.

Trebuie menționat că în urma interacțiunii materie – energie incidentă pot apărea mai multe tipuri de procese diferite în același timp.

Pornind de la noțiunile menționate mai sus, metodele spectrometrice pot fi clasificate în:

-spectrometrie de microunde (spectre de rotație)
-spectrometrie infraroșu sau Raman (spectre de rotație-vibrație)
-spectrometrie ultraviolet și vizibil (spectre electronice)

Spectrele pot fi clasificate și după diferite alte criterii: spectre de emisie și absorbție, spectre continue și discontinue (atomice - linii spectrale, moleculare - benzi spectrale).

Spectrele de emisie se prezintă sub forma uneia sau mai multor linii sau benzi luminoase pe un fond întunecat.

Spectrele de absorbție apar sub forma uneia sau mai multor linii sau benzi întunecate pe un fond luminos.

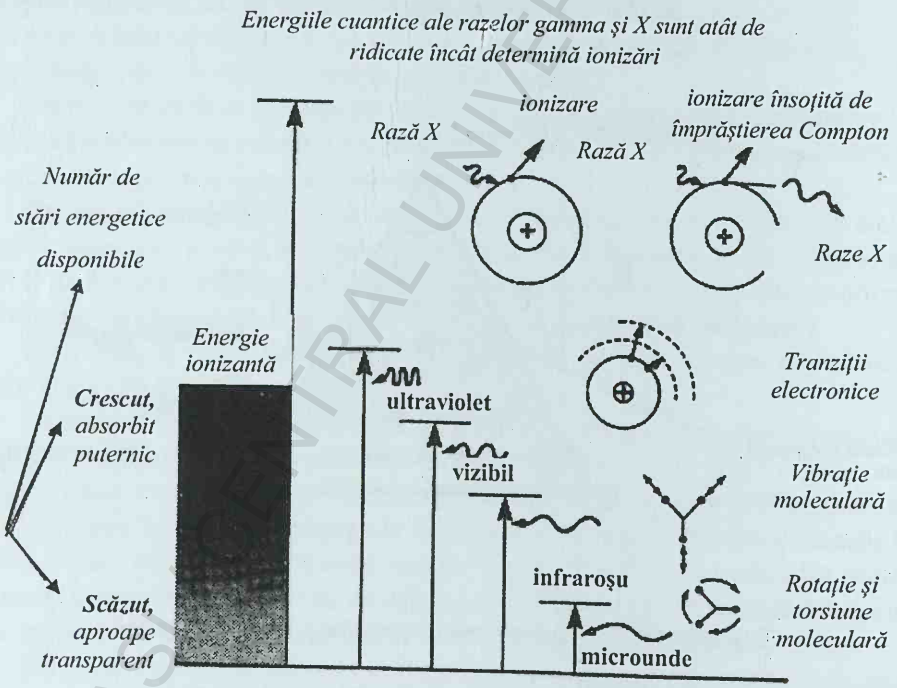


Figura IV.9.1.2. Relația dintre diferite tipuri de spectre și principiul lor fizic (6)

IV.9.2. Spectre de tranziție electronică

Cazul cel mai ușor de înțeles pentru fenomenul de tranziție îl reprezintă **spectrele electronice de tranziție.** În interiorul atomilor electronii sunt distribuiți pe niveluri energetice, conferind structurii o stare energetic stabilă, numită **stare fundamentală.**

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru ca un electron să ajungă pe un nivel energetic superior (stare excitată) sistemul trebuie sa primească energie din exterior; o anumită cantitate din această energie va fi absorbită dacă va corespunde relației:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu_1$$

unde:

ΔE reprezintă variația în starea energetică a electronului, egală cu diferența dintre energiile celor două nivele între care are loc tranziția, E_1 reprezintă energia electronului in starea fundamentală, E_2 reprezintă energia electronului în starea finală (nivel excitat), h este constanta lui Planck (= $6{,}63 \times 10^{-34}$ Js), ν este frecvența radiației electromagnetice absorbite

Energia *ΔE* corespunde energiei radiației electromagnetice absorbite de respectivul atom. Aceasta va fi egală cu energia eliberată după absorbția energiei inițiale (în procesul de excitare), generând spectrul de emisie, care corespunde, în frecvență, cu spectrul de absorbție, pentru aceeași specie atomică (acest fenomen fiind cunoscut și sub numele *de Legea inversiunii liniilor spectrale*).

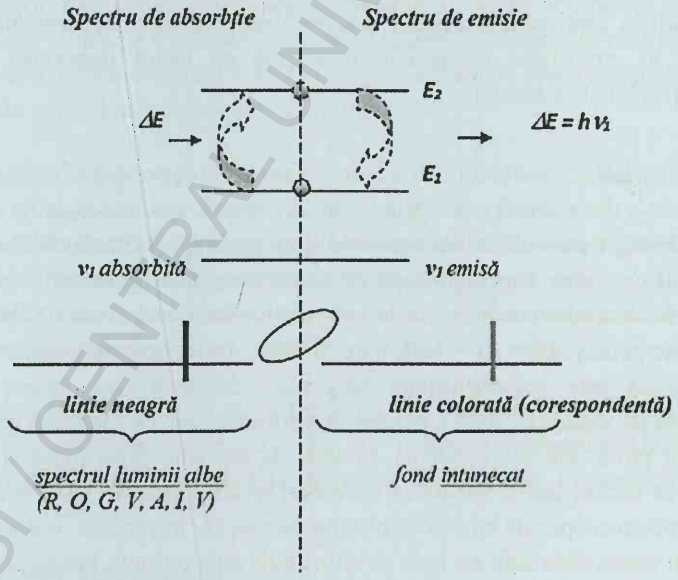


Figura IV.9.2.1. Principiul spectrelor electromagnetice de tranziție electronică (de absorbție și de emisie)

Spectre de absorbție

Spectroscopia de absorbție măsoară pierderea de energie electromagnetică după interacțiunea radiației cu substanța studiată. De exemplu, dacă un fascicul de lumină conținând o succesiune de lungimi de undă (spectru continuu) este direcționat către o incintă cu atomi, ioni sau molecule, particulele vor absorbi acele lungimi de undă care le

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

permit tranziţia de pe o stare cuantică pe alta. Ca urmare, lungimile de undă absorbite vor lipsi dintre lungimile de undă iniţiale (spectrul iniţial) după ce a trecut prin substanţă.

Întrucât majoritatea atomilor şi moleculelor deţin nivele energetice unice şi identificabile, măsurarea liniilor de absorbţie permite identificarea speciilor absorbante ale acestora.

Absorbţia luminii în atmosferă

Proprietăţile de transmisie ale atmosferei Pământului determină care component ale spectrului electromagnetic al Soarelui şi alte surse astronomice de unde electromagnetice sunt capabile să treacă prin atmosferă. Absorbţia radiaţiei X şi UV de către atmosfera superioară împiedică această porţiune de spectru să atingă Pământul. Faptul că vaporii de apă, dioxidul de carbon şi alte gaze reflectă radiaţia infraroşie este important în stabilirea cantităţii de căldură pierdută de Pământ prin radiaţie emisă în spaţiu. Acest fenomen, denumit adesea *efect de seră,* funcţionează după acelaşi principiu ca şi panourile de sticlă dintr-o seră. Într-o seră energia electromagnetică sub forma luminii în vizibil este capabilă să treacă prin sticlă şi să pătrundă în seră. Lumina în domeniul vizibil interacţionează cu obiectele din interiorul serei, iar aceste obiecte absorb, cel puţin parţial, lumina. O parte din această energie absorbită este reemisă ca radiaţie în infraroşu, care este reflectată de către sticlă înapoi în seră, păstrând astfel sera încălzită. Într-un mod asemănător, spectrul de transmisie al atmosferei Pământului reprezintă un factor important în determinarea temperaturii globale a acestuia.

Spectre de emisie

Cea de-a doua formă principală de spectroscopie, spectroscopia de emisie, utilizează o anumită energie pentru a *excita* sistemele atomice din proba studiată, electronii tranzitând pe un nivel energetic superior. După ce atomii sau moleculele sunt *excitate*, aceştia se *relaxează* în mod spontan către niveluri energetice inferioare şi emit radiaţie caracteristică variaţiei energetice, $\Delta E = h\nu = hc/l$, între diferite niveluri energetice ale atomilor. Această radiaţie emisă este complementară lungimilor de undă care lipsesc din spectru în spectroscpia de absorbţie. Astfel, benzile de emisie servesc ca amprentă ce poate fi asociată unui singur atom, ion sau moleculă. Metode de excitaţie experimentală implică, adesea, introducerea probei într-o flacără (a se vedea lucrările practice) sau o descărcare în arc electric. Spectroscopia de emisie în plasmă este şi ea, în prezent, utilizată în acest scop. Atomii sau moleculele sunt excitate de coliziunile cu electronii, banda largă de lumină din sursa de excitaţie, sau coliziuni cu atomi energetic. Analiza liniilor de emisie se poate efectua cu ajutorul aceloraşi tipuri de spectrometre/spectroscoape utilizate şi în spectroscopia de absorbţie.

Spectroscopia de absorbţie în UV - Vizibil

Majoritatea moleculelor absorb lumină în domeniul vizibil şi în UV. Absorbanţa unei soluţii creşte odată cu creşterea gradului de atenuare a fasciculului. Absorbanţa, A, este direct proporţională cu lungimea drumului parcurs de radiaţie, b, şi cu concentraţia, c, a speciei absorbante.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARY LIBRARY

Legea *Beer* afirmă:

$$A = \varepsilon bc,$$

unde: ε este o constantă de proporționalitate, denumită absorbtivitate.

Molecule diferite absorb radiație la lungimi de undă diferite. Un spectru de absorbție va indica un număr de benzi associate grupărilor structurale din molecula pe care o constituie (ex.: gruparea carbonil în acetonă absoarbe în regiunea UV la aceeași lungime de undă ca și gruparea carbonil din dietil cetonă).

IV.9.3 Spectrometria de microunde (spectre de rotație)

Cele mai simple molecule care pot da spectre de rotație sunt moleculele biatomice dar trebui reținut faptul că doar moleculele cu moment dipolar permanent pot da spectre de rotație. De exemplu, moleculele H_2, N_2, Cl_2, Br_2, care nu au dipol permanent nu dau spectre de rotație. Spectrometria de microunde poate fi folosită doar pentru moleculele care au cel puțin 25 de atomi; această metodă poate da informații despre distanțele interatomice și, indirect despre structură. Spectrele din domeniul microunde reprezintă una din cele mai exacte metode pentru măsurarea distanțelor interatomice. Pentru a înțelege, trebuie să considerăm cazul unei molecule biatomice și modelul teoretic al clopotului mut rigid care, în rotație liberă, va avea o mișcare în jurul unei axe perpendiculare pe conexiunea dintre cei doi atomi, care trece prin centrul de greutate al sistemului.

IV.9.4. Spectrometria în infraroșu și Raman (spectre de vibrație-rotație)

Mișcările de vibrație ale moleculelor pot fi studiate utilizând, ca și în cazul mișcărilor de rotație, un model mecanic macroscopic. Cel mai simplu caz este cel al moleculei biatomice care poate fi asimilat, ca și anterior, cu un clopot mut, dar unul elastic. În acest caz, sunt două mase conectate printr-un resort elastic.

Când o moleculă este excitată cu o frecvență din domeniul de vibrație, distanțele interatomice pot fi considerate egale cu cele din molecula biatomică aflată în stare fundamentală, nonvibrațională, având același moment de inerție, și în consecință aceeași mișcare de rotație.

Energia toatală a moleculei va fi :

$$E = E_{rotation} + E_{vibration}$$

De obicei, pentru ca să apară ambele mișcări, molecula trebuie să absoarbă o energie mare.

A fost demostrat faptul că, în scopul de a modifica doar starea de vibrație a moleculei, energia trebuie să fie egală cu diferența energiilor (corespunzătoare subnivelurilor tranzitate).

În cazul unei molecule biatomice, cei doi atomi pot face doar un tip de mișcare de vibrație, în jurul legăturii de valență. Moleculele poliatomice pot avea mai mult decât o mișcare de vibrație; un grup de atomi pot avea o mișcare sincronizată, etc. Complexul

BCU IASI (CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mișcărilor de vibrație a mai multor molecule poate fi considerat ca fiind rezultatul unui număr simultan de vibrații normale, cu condiția ca centrul de gravitație a întregii molecule să rămână neschimbat. În momentul excitării vibraționale a unei molecule, după absorbția energiei incidente, energia si amplitudinea unei singure vibrații normale va crește, respectiv aceea a cărei frecvență corespunde cu frecvența absorbită.

Principiul *efectului Raman* presupune că: lumina monocromatică difuzată într-un mediu transparent conține, pe langă frecvența luminei incidente, un număr de linii cu frecvență mică (linii ***Stokes***) și un număr foarte mic de linii cu frecvență foarte mare, dispuse simetric în relație cu liniile ***Stokes*** (numite linii anti-***Stokes***).

Spectrele Raman pot avea aplicații în domeniul medical pentru identificarea unor molecule în relație cu dignosticul unor boli.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

V. ASPECTE BIOFIZICE ALE MACROMOLECULELOR

V.1. Macromoleculele: caracteristici generale în biosisteme
V.2. Caracteristici biofizice ale structurilor proteice
V.3. Aspecte biofizice ale structurii acizilor nucleici

V.1. Macromoleculele: caracteristici generale în biosisteme

Macromoleculele sunt molecule mari care conţin mii sau chiar milioane de atomi. Aproximativ 20% din greutatea unei celule vii este constituită din macromolecule precum polizaharidele, proteinele şi acizii nucleici. Forma, funcţia şi proprietăţile lor biofizice sunt diferite în relaţie cu tipul şi localizarea lor. De exemplu, în celulă, acizii nucleici poartă informaţia care dirijează activitatea celulară; celelalte macromolecule sunt efectoare. Structura de rezistenţă a organelor include macromolecule precum colagenul, responsabil de determinarea geometriei; celulele sunt limitate de către membrane care conţin macromolecule – bariere antientropice – iar acestea controlează comunicarea celulei, sistem deschis, cu celelalte structuri înconjurătoare. Acest tip de macromolecule are rol în controlul metabolic şi/sau sunt structuri informaţionale. Celulele nu produc macromolecule prin asamblarea atomilor individuali ci prin cuplarea unor *unităţi preformate* - ***monomeri***, diferite în relaţie cu tipul de macromoleculă finală (***polimer***): în cazul proteinelor - amino-acizi, în cazul acizilor nucleici – nucleotide. Pentru a forma fiecare tip de macromoleculă, componentele sunt cuplate împreună prin reacţii chimice similare dar distincte, de fiecare dată cu *eliminarea unei molecule de apă.* În cazul proteinelor şi a acizilor nucleici, componentele sunt cuplate termino-terminal, pentru a forma lanţuri (de obicei) lungi, neramificate, ce constituie o „coloană vertebrală"; unităţile însele pot avea ramificaţii atomice. Forma finală a macromoleculei depinde de tipul şi de structura sa conformaţională – geometrică, fibrilară, neramificată sau ramificată, globulară etc. Structura sa poate fi studiată cu ajutorul spectroscopiei RMN şi prin difracţie cu raze X.

Cîteva exemple de macromolecule sunt date în tabelul următor. În acest capitol ne vom concentra pe aspectele biofizice ale ***proteinelor*** şi ale ***acizilor nucleici***, pentru că multe dintre structurile şi procesele biofizice descrise în următoarele câteva capitole depind de proprietăţile acestor molecule.

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

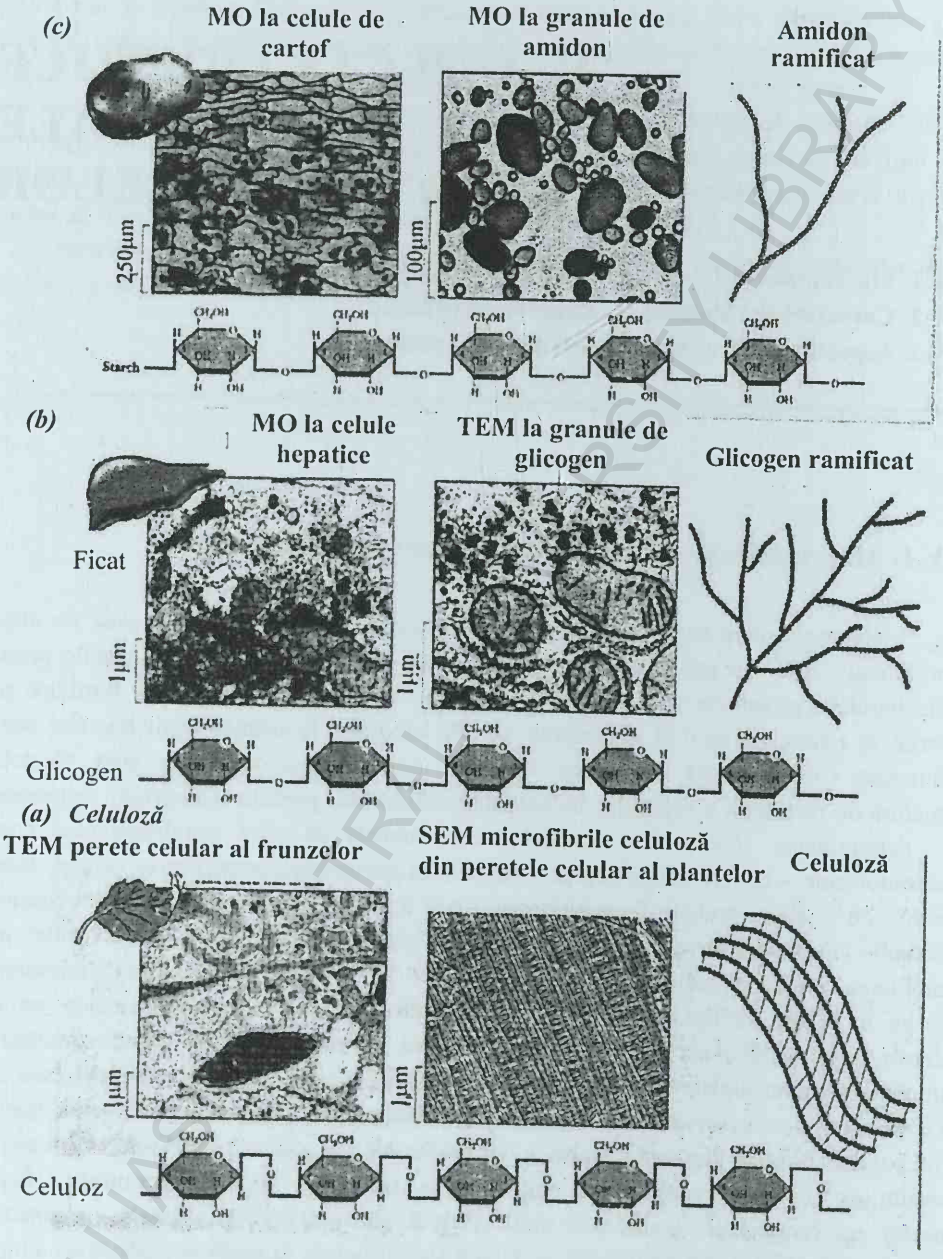


Figura V.1.1. Exemple de macromolecule și caracteristicile lor în microscopie optică (MO) sau microscopie electronică de transmisie (TEM) și de baleiaj (SEM) (107)

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

V.2. Caracteristicile biofizice ale structurilor proteice

Proteinele sunt polimeri compuși din lanțuri de aminoacizi sau lanțuri asamblate de monomeri (unități alcătuite din resturi de aminoacizi), legate cap la cap prin legături covalente numite ***legături peptidice***, în care capătul *carboxil* al unui aminoacid se alătură capătului *amino* al următoarului aminoacid. Un lanț mai scurt de resturi de aminoacizi cuplați între ei se numește ***polipeptid***. Prin convenție, aminoacidul N-terminal este considerat începutul lanțului și cel C-terminal - capătul lanțului (proteinele sunt biosintetizate în acest sens).

O proteină poate consta dintr-un singur polipeptid sau mai multe polipeptide. În proteinele cu mai mult de un lanț, lanțurile individuale sunt ținute, conformațional, strâns și specific unite (dar nu covalent), astfel încât macromoleculele se comportă în întregime ca ***o singură unitate***. Lanțurile pot să fie sau să nu fie identice între ele.

Patru niveluri de organizare pot fi descrise:

- ***Structura primară*** – se referă la aranjamentul liniar, succesiunea resturilor de aminoacizi în lanțul polipeptidic și la locația legăturilor covalente (în principal legăturile –S-S-) dintre lanțuri;
- ***Structura secundară*** ține de aranjarea spațială a acestor lanțuri în structuri regulate (α–helixurile și foile β–pliate);
- ***Structura terțiară*** include plierea regiunilor dintre α–helixuri și foi β–pliate, precum și combinarea acestor trăsături secundare în forme compacte (formând *domenii* ale proteinei);
- ***Structura cuaternară*** se referă la organizarea mai multor lanțuri polipeptidice (numite *subunități*) într-o moleculă unitară proteică (precum hemoglobina, de exemplu).

Structura primară

Definește secvența resturilor de aminoacizi (există doar 20 de aminoacizi „esențiali" care pot fi folosiți de organismul viu în structura primară, ca și *coloană vertebrală* a proteinelor, dar numărul de tipuri de proteine în proteomul uman poate fi de sute de mii ...) și este dictată de secvența de baze a genei/genelor care îi corespund. Indirect, structura primară definește de asemenea compoziția calitativă de aminoacizi (care din cei 20 de aminoacizi posibili sunt prezenți) și conținutul (proporțiile relative ale aminoacizilor prezenți).

Legătura peptidică (***Figura V.2.2.***), care leagă resturile individuale de aminoacizi dintr-o proteină, este deopotrivă rigidă și plană, fără posibilitatea de rotire în jurul legăturii carbon-azot, din cauză că are un caracter considerabil de legătură dublă, ca urmare a delocalizării perechii libere de electroni de pe atomul de azot; aceasta, împreună cu geometria tetraedrică în jurul fiecărui atom de carbon α, influențează definitoriu aranjarea tridimensională pe care o adoptă lanțul polipeptidic.

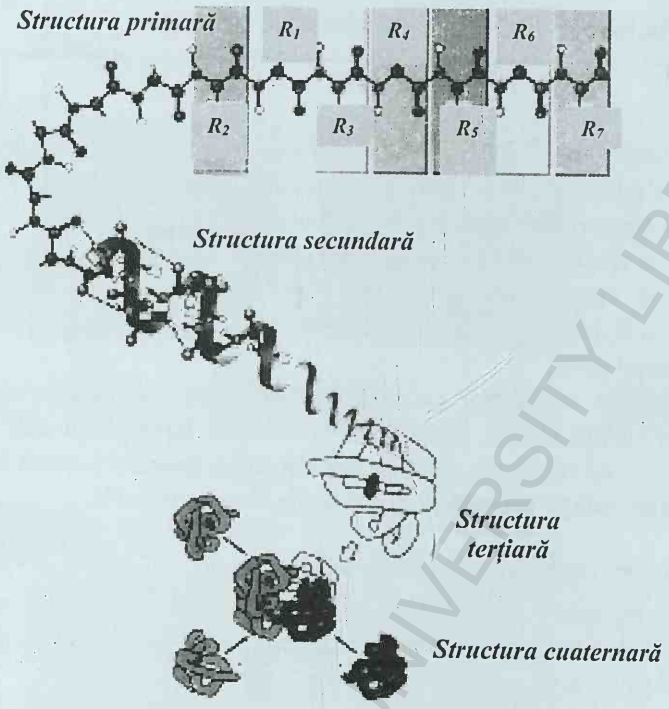


Figura V.2.1 Relația dintre structurile primară, secundară, terțiară și cuaternară ale proteinei (107)

Toți aminoacizii care participă la structura proteinei au în comun un *atom central de carbon* (C) la care sunt atașați un atom de hidrogen, *o grupare amino* (NH_2) și o *grupare carboxil* (COOH). Ce disting proteinele sunt radicalii laterali. Aminoacizii folosiți de organismul viu pentru a forma proteine variază în *dimensiune*, *formă*, *sarcină* și *reactivitate* chimică și printr-un *codon diferit* în codul genetic.

S-a calculat că într-un lanț polipeptidic conținând cei 20 de aminoacizi, cu fiecare rest apărând o singură dată, numărul total de secvențe posibile este de 2×10^8.

Din *punct de vedere electric*, aminoacizii pot fi clasificați ca făcând parte din una din următoarele clase, la pH neutru: *alifatici, polari fără sarcină, aromatici; polari cu sarcină*. Ca urmare, tipul de aminoacizi are o mare importanță pentru interacțiunile intramoleculare electrostatice, respectiv pentru structura secundară, conformațională și interacțiunile intermoleculare ale proteinei.

Nouăsprezece dintre aminoacizi sunt *α-aminoacizi* (grupările amino și carboxil sunt atașate atomului de carbon care este adiacent grupării carboxil) cu formula generală R-$CH(NH_2)COOH$, unde R este un grup alifatic, aromatic sau heterociclic. Singura excepție de la această formulă generală este ***prolina***, care este un alt tip de aminoacid, un *iminoacid* (gruparea -NH_2 este încorporată într-un inel cu 5 membri). Cu excepția celui mai simplu aminoacid, ***glicina*** (R = H), toți ceilalți aminoacizi găsiți în proteine conțin un atom de carbon asimetric și sunt, prin urmare, activi optic, având o *configurație levogiră*.

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

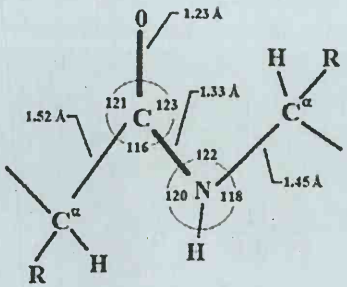


Figura V.2.2. Legătura peptidică: diagrama unghiurilor legăturilor (în grade), lungimile legăturilor și geometria lor generală (43)

Pentru convenienţă, fiecare aminoacid găsit în proteine este desemnat printr-o prescurtare de trei sau de cinci litere, în general în funcţie de primele trei litere din nume, sau un simbol de o literă, în unele cazuri fiind prima literă a denumirii.

Din cauză ca au atât o grupare amino cât şi una carboxil, aminoacizii sunt *ionizaţi la toate valorile pH-ului.*

Aşadar, la valori scăzute ale pH-ului, un aminoacid există sub formă de cation şi la valori crescute, sub formă de anion. La un anume pH intermediar, aminoacidul nu are o încărcătură netă, cu toate că este tot ionizat. S-a demonstrat că, în stare cristalină şi în soluţie apoasă, aminoacizii există predominant în această formă, „fără sarcină". Asta le conferă proprietăţi caracteristice compuşilor ionici, precum punct ridicat de topire şi de fierbere, solubilitate în apă, insolubilitate în solvenţi organici nepolari. Punctul izoionic reprezintă pH-ul la care numărul de sarcini negative de pe moleculă produse de ionizarea grupului carboxil este egal cu numărul de sarcini pozitive dobândite de acceptarea protonilor de către grupul amino. În cazul aminoacizilor, acesta este egal cu punctul izoelectric (p_i), din moment ce molecula nu are o sarcină netă şi este, aşadar, imobilă electroforetic.

Legăturile *scheletului* polipeptidic pot să permită multe conformaţii diferite. De exemplu, un lanţ polipeptidic poate să se rotească în jurul legaturii amide azot - α-carbon şi în jurul legăturii α-carbon - carbon carbonil. În principiu, rotaţia în jurul acestor legături poate avea loc continuu. Cu toate acestea, interacţiunea electrostatică legată de prezenţa catenelor laterale de aminoacizi limitează posibilele conformaţii. Ca urmare a acestor interacţiuni de vecinătate (interacţiuni între resturi învecinate) rezultă structura secundară.

Multe proteine leagă ioni metalici (ex. Ca^{2+} sau metale grele precum Zn, Fe etc.) care ar trebui consideraţi părţi integrale ale proteinei funcţionale (în special enzimele). În unele cazuri la lanţurile peptidice sunt adăugaţi liganzi (ex. inelul porfirinic în hemoglobină). Apa este, probabil, asociată intim cu toate proteinele solubile.

Aminoacizii sunt deosebiţi prin catenele lor laterale sau grupările *R*. Structura chimică a proteinelor este realizată, deci, prin legături covalente (fiecare legătură covalentă poate fi imaginată ca o pereche de electroni pe care o împart cei doi atomi conectaţi) care pot fi rupte, în unele condiţii, de enzime speciale (proteaze).

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

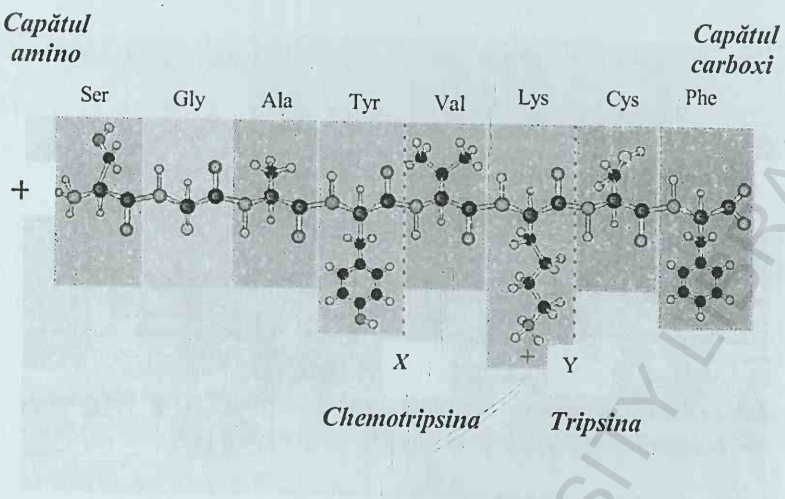


Figura V.2.3. Structura primară a unui polipeptid, arătând locurile unde diferite enzime – proteaze– pot digera lanțul (X – chemotripsina ; Y - tripsina) – (107)

Structura secundară

Lanțul lung de resturi de aminoacizi (care formează structura primară a unei proteine) nu poate rămâne *liniar* din cauza prezenței resturilor polare. Prin urmare, interacțiuni electrostatice, noncovalente au loc între resturi învecinate, în special legături de hidrogen între hidrogenul din amidă și oxigenul carboxilului (NH ... O=C) determinând plierea localizată. O nouă conformație a proteinei ia naștere, numită *structura secundară.* S-a demonstrat că acest tip de structură are niște caracteristici generale, printre care și *ordonarea și repetitivitatea.* Două tipuri de structuri au fost identificate și bine descrise până în prezent.

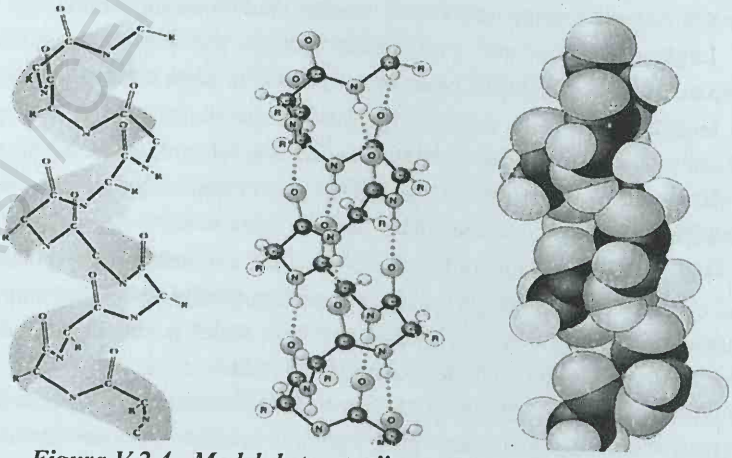


Figura V.2.4. Modelul structurii secundare: α helix (sunt vizibile, punctat, legăturile de hidrogen) – (107)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Acestea sunt: structura *α helix* și structura de *β foaie pliată*, în relație cu localizarea plierii lanțului polipeptidic datorită legăturilor de hydrogen.

Cel care definește conformațiile pe care un lanț polipeptidic le poate lua este *caracterul de dublă legătură parțială* al legăturii peptidice. În cadrul aceleiași proteine, regiuni diferite ale lanțului polipeptidic pot lua diferite conformații, determinate de secvența primară de aminoacizi. Se pare că unii aminoacizi, cum sunt prolina, izoleucina, triptofanul și asparagina, alternând cele două tipuri de structuri secundare.

Structura secundară α-helix este o structură întâlnită frecvent la proteinele globulare.

Formarea α-helixului este spontană și este stabilizată de legăturile de hidrogen dintre azotul amidelor si carbonul carbonil al legăturilor peptidice situate la patru resturi distanță.

Orientarea aceasta a legăturilor de hidrogen produce o spiralare helicală a scheletului proteic de așa natură încât grupările laterale *(R)* se găsesc la exteriorul helixului și perpendicular pe axa lui.

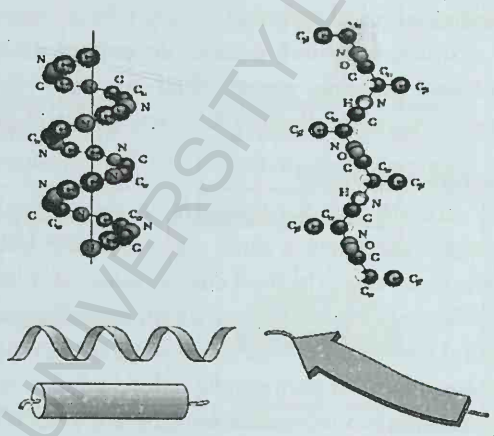


Figura IV.2.5. Structurile proteice α-helix (dreapta) și β-pliat (stânga) (124)

Plierea și alinierea porțiunilor scheletului proteic una lângă alta pentru formarea lanțurilor-β este stabilizată tot prin legăturile de hidrogen dintre azotul amidelor și carbonul carbonil. Foile β se numesc *pliate*. Aceasta se datorează poziționării carbonului α în legătura peptidică care alternează deasupra și sub planul foii. Foile β sunt fie *paralele*, fie *antiparalele*. În foile paralele, lanțurile peptidice adiacente merg în aceeași direcție (ex. dinspre capătul N-terminal către cel C-terminal), pe când, în foile antiparalele, lanțurile adiacente sunt aliniate în direcții opuse.

Structura terțiară

Definește configurația tridimensională a lanțului polipeptidic. Este stabilizată prin atracția electrostatică dintre grupările ionice cu încărcături opuse (- NH^{3+}, COO^-), prin forțe slabe van der Waals, prin legături de hidrogen, prin interacțiuni hidrofobe și, în unele proteine, prin punți disulfidice (- S – S -) formate prin oxidarea grupărilor de sulfhidril (-SH) din resturile de cisteină adiacente spațial,.

Conformația tridimensională a lanțurilor polipeptidice este de așa natură încât interiorul este constituit predominant din resturi de aminoacizi nepolare, hidrofobe, precum valina, leucina, fenilalanina. Resturile polare, ionizate și hidrofile se găsesc înspre exteriorul moleculei, unde sunt compatibile cu mediul apos. Cu toate acestea, unele proteine au și resturi hidrofobe pe exterior și prezența acestor resturi este importantă în unele procese biochimice (cromatografie).

SCUTSJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura terțiară a proteinelor a fost analizată prin cristalografie cu raze X și, mai recent, prin spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN). S-a ajuns, astfel, la următoarele observații: 1) conformațiile grupurilor polipeptidice indviduale se găsesc, de regulă, în cele mai stabile regiuni prezise din studii; 2) resturile polare au tendința să fie concentrate pe suprafețele exterioare ale moleculelor proteice, în mediul apos, dar dacă o moleculă proteică este introdusă într-un mediu lipidic, cum este membrană celulară, resturile nepolare au tendința să fie la exterior; 3) moleculele polare sunt localizate pe suprafață, unde se pot lega de apă, sau în interior, unde formează legături de hidrogen cu alte resturi polare. Cu toate acestea, sunt cunoscute și excepții de la aceste reguli (ex. resturi nepolare pot apărea la interfața cu medii apoase).

Structura terțiară descrie, de asemenea, interacțiunea dintre diferitele domenii din cadrul unei proteine, aceasta fiind guvernată de forțe noncovalente, slabe: *legaturile de hidrogen, interacțiunile hidrofobe, interacțiunile electrostatice și forțele van der Waals.*

Structura cuaternară

Această formă caracterizează doar proteinele oligomerice care sunt formate din asocierea / alăturarea a două sau mai multe lanțuri polipeptidice atașate tot prin legături noncovalente, slabe (legături *electrostatice, de hidrogen, legături van der Waals, interacțiuni hidrofobice și ocazional punți disulfidice*). Prin urmare, punțile disulfidice pot exista fie în interiorul unui lanț peptidic (intra-lanț), fie ca mod de legatură între diferite lanțuri peptidice (inter-lanț). Un lanț polipeptidic individual dintr-o proteină oligomerică poartă denumirea de *subunitate.* Subunitățile unei proteine pot fi identice sau diferite: de exemplu, hemoglobina este formată din două lanțuri α și două lanțuri β, iar lactat dehidrogenaza din patru lanțuri peptidice identice.

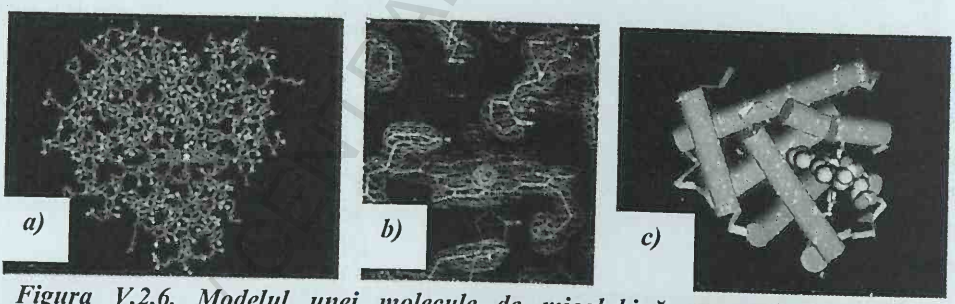


Figura V.2.6. Modelul unei molecule de mioglobină, prezentând structura conformațională. a) Modelul generat pe calculator, arătând aranjarea tridimensională a tuturor atomilor; calculatorul îl poate roti pentru a oferi diferite perspective. b) O reprezentare detaliată a atomilor din vecinătatea regiunii mioglobinei care leagă oxigenul; modelul arată grupul hem. c) Un model „panglică" al mioglobinei, arătând aranjamentul moleculei hem, fixatoare de oxigen (formele rotunde) și a structurilor helicale (formele de panglică) - (107)

În mod obișnuit, proteinele sunt clasificate în funcție de structura lor cuaternară în două grupuri - globulare și fibrilare. Cele globulare au formă aproximativ sferică, sunt în general solubile în apă și conțin o combinație de lanțuri α-helix, foi β-pliate și structuri fără o aranjare precisă. Din grupul proteinelor globulare fac parte enzimele, proteinele de transport,

hormonii și imunoglobulinele. Proteinele fibrilare sunt proteine structurale, insolubile în apă, constituite din grupări lungi, aranjate în lanțuri asemănătoare unor cabluri, formate prin alăturarea unor structuri ordonate sub formă α-helicală sau de β pliate. În acest grup sunt incluse keratina din păr și colagenul din piele.

Conformația proteinei se modifică prin denaturare. Procesul de denaturare duce la pierderea activității biologice, scăderea solubilității în apă și creșterea susceptibilității la degradare proteolitică. Denaturarea proteică poate fi cauzată de expunere la temperaturi ridicate, la reactivi acizi sau alcalini, detergenți, solvenți organici și cationi metalici cu greutate moleculară mare ca mercurul și plumbul. Denaturarea duce la pierderea structurii (terțiare) tri-dimensionale și expunerea numeroaselor grupări hidrofobice, protejate anterior de structura cuaternară împachetată, la mediu lichid.

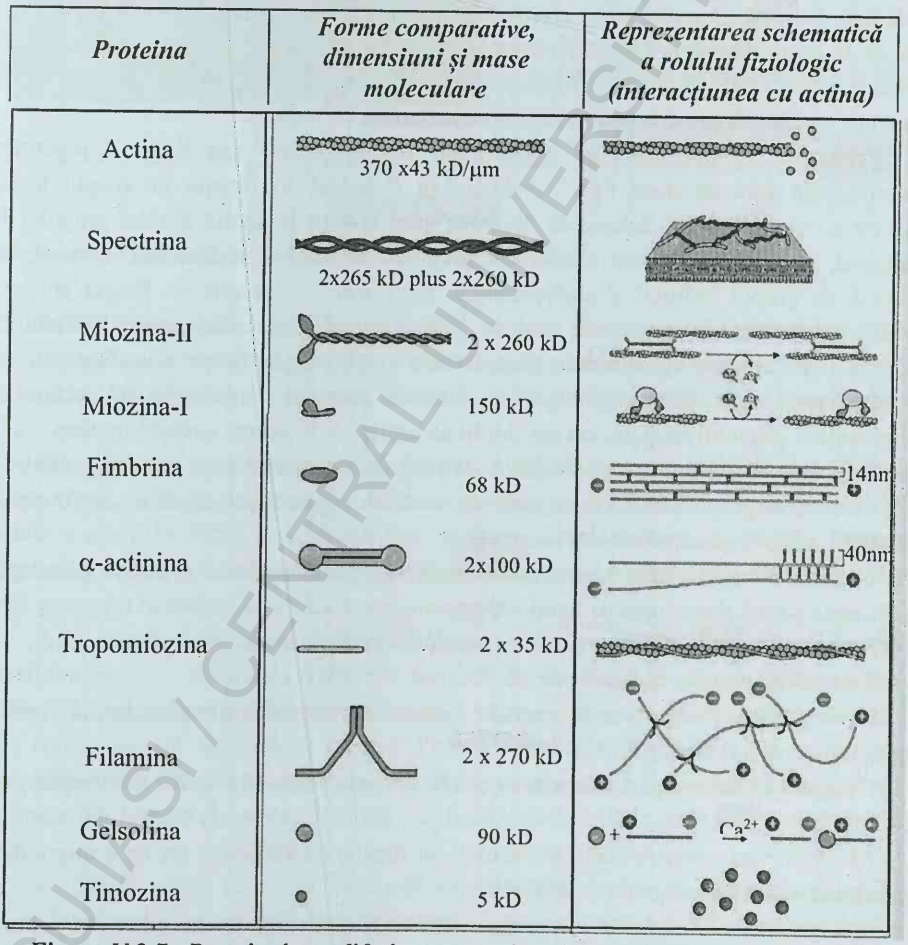


Figura V.2.7. Proteinele cu diferite structuri conformaționale pot avea diferite roluri (exemple de proteine care interacționează cu actina) – (107)

În anumite tipuri de proteine (enzime), împachetarea tridimensională a lanțului sau a lanțurilor polipeptidice duce la juxtapunerea unor grupări amino terminale constituind situsul activ sau catalitic. Enzimele cu structură oligomerică posedă multiple astfel de situsuri. Numeroase enzime posedă și una sau mai multe regiuni regulatorii. Studiul cristalografic, cu

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ajutorul razelor X, a demonstrat că regiunea activă este adesea localizată într-o zonă delimitată de fragmente amino terminale hidrofobe, dar care conține unele resturi polare. Atașarea enzimei la substrat implică participarea unor regiuni amino terminale.

Există enzime oligomerice care prezintă mai multe forme, acestea se numesc izoenzime sau izomeri enzimatici. Existența lor este rezultatul prezenței a două gene asemănătoare care duc la sinteza unor subunități similare, dar nu identice. Un exemplu cunoscut este cel al izoenzimelor lactat dehidrogenazei care poate alterna gruparea piruvat cu lactat. Lactat dehidrogenaza este un tetramer cu cinci forme posibile (LDH1 până la LDH5) corespunzând celor 5 permutări posibile între cele 2 subunități componente (H și M), diferite printr-o singură grupare amino, grupate sub formă tetramerică. Fiecare izoenzimă promovează același tip de reacție, dar ceea ce diferă sunt caracteristicile biofizice: *constanta kinetică, stabilitatea termică și mobilitatea electroforetică*. Distribuția tisulară a acestor izoenzime diferă de la un organism la altul, de exemplu în organismul uman LDH 1 este localizată cu precădere în miocard, în timp ce LDH 5 predomină în ficat și mușchi, dozarea lor fiind utilizată ca *marker diagnostic* pentru stabilirea leziunilor de organe.

Proteinele se pot atașa de carbohidrați (glicoproteine) sau lipide (lipoproteine). Glicoproteinele sunt de două tipuri, *N-linked* și *O-linked*, în funcție de situsul legăturii covalente cu carbohidrații. Zaharurile *N-linked* sunt atașate la azotul amidei grupului R al asparaginei; cele *O-linked* sunt atașate de gruparea hidroxil a serinei sau a treoninei și, ocazional, de grupul hidroxil al aminoacidului modificat - *hidroxilizina*. Există grupuri de glicoproteine extrem de importante care se găsesc pe suprafața eritrocitelor. Variabilitatea compoziției în carbohidrați a multor glicoproteine și glicolipide de pe suprafața globulelor roșii este responsabilă, de exemplu, pentru stabilirea grupului sanguin. Există peste 100 de determinanți ai grupului sanguin, cei mai mulți ca urmare a diferenței carbohidraților.

Cele mai întâlnite grupe de sânge, A, B și O, sunt produsul unor gene responsabile de încorporarea unor grupuri distincte de zaharuri în structura glicosfingolipidelor din membrana eritrocitelor, cât și a glicoproteinelor secretate.

Complexele structurale care implică asocierea dintre proteine și lipide prin legături noncovalente poartă denumirea de lipoproteine.

Proteinele pot fi studiate prin diferite metode (de separare și de analiză).

Enumerăm mai jos câteva dintre ele:

Centrifugarea - separă componentele celulare în funcție de dimensiunea și densitatea acestora utilizând forța centrifugă.

Cromatografia - separă macromoleculele pe baza interacțiunii lor diferențiate cu un suport solid.

Electroforeza - separă macromoleculele în funcție de abilitatea lor de a migra diferit, pe un suport, sub acțiunea unui curent electric.

Metode care utilizează și anticorpi - utilizează anticorpi pentru a marca și purifica anumite componente celulare: *microscopie cu imunoflorescență* - marchează antigenii pentru a facilita vizualizarea lor la microscop; *cromatografia de afinitate* - în funcție de afinități imunologice; *imuno-electroforeza* - marchează antigenii pe un substrat de gel.

Secvențializarea aminoacizilor - analiza secvenței aminoacizilor din polipeptide.

Cristalografia cu raze X, Spectroscopia RMN - analiza structurii tridimensionale a macromoleculelor.

Watson și Crick și modelul de structură ADN (130)

V.3. Aspecte biofizice ale structurii acizilor nucleici

Introducere: despre descoperirea structurii ADN-ului

ADN-ul este molecula polimerică, acid nucleic, ce transportă informația genetică. Este o moleculă extrem de lungă, dar în acelasi timp foarte simplă, alcătuită din secvențe de patru unități de bază, puse împreună. Această moleculă este integrată în cromozomi, în nucleul celulei.

O contribuție esențială la elucidarea structurii ADN-ului au avut-o ***Jim Watson*** și ***Francis Crick,*** alături de ***Maurice Wilkins*** și ***Rosalind Franklin.*** Deoarece ***Rosalind Franklin*** a murit în 1958, doar primii trei, ***Wilkins, Crick și Watson,*** au fost, împreună, recompensați pentru aceasta prin acordarea ***Premiului Nobel pentru Medicină și Fiziologie,*** în 1962 (premiul Nobel nu se atribuie post-mortem).

Această structură - *dublu helix a ADN-ului* - a sugerat modul in care are loc copierea materialului genetic. Molecula ADN este formată din două catene care se înfășoară una pe cealaltă - *dublul helix* - iar fiecare bază a unei catene este asociată cu o bază diferită din catena soră, conform unei reguli precise. Pentru a se replica, spirala ADN se desface și fiecare catenă este folosită ca un șablon pe care se asamblează o altă parte dintr-o rezervă de baze libere din interiorul celulei. În acest fel, fiecare catenă dă naștere unu nou dublu helix identic.

O dilemă a fost răspunsul la următoarea întrebare: cum se poate ca molecula de ADN sa dețină toate informațiile genetice necesare pentru a determina fiecare mic detaliu al corpului nostru? ***Crick*** și ***Sidney Brenner***, parte a unui grup internațional de oameni de știință, au încercat să răspundă la această întrebare. Datele au demonstrat că molecula de ADN nu este capabilă să formeze o replică a ei înșiși. Astfel, a fost adusă în discuție ***codul genetic***. Așa cum au descoperit ***Crick*** și ***Brenner***, un rol-cheie a fost jucat de un alt acid nucleic, ARN. Se știa, deja, că sinteza proteinelor are loc în ribozomi, care conțin, de asemenea, ARN. Molecula de ARN mesager transmite informațiile de la ADN.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Structura primară și secundară a ADN și ARN

În structura lor primară, ADN și ARN sunt polimeri liniari, ale căror unități de bază sunt numite ***nucleotide.***

Nucleotidele sunt un grup de molecule formate din compuși ciclici ce conțin azot (baze ***purină*** și ***pirimidină***) legați la primul carbon dintr-un cliclu glucidic cu cinci atomi de carbon, cu o grupare fosfat atașată la al treilea sau la al cincilea carbon glucidic.

Structura ADN

Un lanț ADN (reprezentat în ***Figura V.3.1***) se formează prin legături fosfodiester între grupările *fosfat* și grupările *hidroxil* (OH) la pozițiile 5 'și 3' ale zaharurilor din nucleotidele adiacente. În ADN, bazele sunt de obicei *adenina (A), citozina (C), guanina (G), timina (T). Adenina* și *guanina* sunt membri ai unei clase de compuși ciclici care conțin azot, cu două inele, numite *purine. Citozina* și *timina* sunt derivați ai unor compuși ciclici cu un singur inel de șase atomi de carbon, numite *pirimidine.*

În ADN, zahărul este 2'deoxiriboză, care nu are o grupare OH la 2'OH găsită pe *riboza* din ARN. Mai mult, în moleculele de ARN, *timina* este înlocuită cu o bază *pirimidină* strâns legată, cunoscută sub numele de *uracil* (U). Formula chimică a *uracilului* este identică cu cea a *timinei*, cu excepția faptului că îi lipsește gruparea metil la poziția 5 'a inelului de carbon.

Adenina și timina se pot asocia cu legături de hidrogen pentru a forma o structură ușor răsucită, dar în esență plată.

Modelul propus de ***Watson*** și ***Crick*** pentru structura ADN-ului a fost denumit *dublu helix*. ADN-ul este reprezentat sub forma a două elici anti-paralele, cu un diametru total de aproximativ 18 Å. Fosfații din secvențele fosfat-glucidice sunt conectați pe o parte la cel de-al cincilea atom de carbon al zahărului și pe cealaltă parte la al treilea atom de carbon al zahărului. Lanțurile sunt formate din secvențe: zahăr-fosfat-zahăr etc., iar bazele sunt în interior (atașate la zaharuri).

Legătura de hidrogen are o mare importanță în structura ADN-ului: bazele atașate la o catenă elicoidală sunt cuplate de cele atașate celeilalte catene elicoidale prin legături de hidrogen. *Adenina* este asociată cu *timina* prin două legături de hidrogen și *guanina* este asociată cu *citozina* prin intermediul a trei legături de hidrogen, astfel încât ***Watson*** și ***Crick*** au demonstrat următorul lucru: concentrațiile relative ale bazelor din ADN trebuie să satisfacă următoarea relație:

$$(A)/(T) = (G)/(C) = 1$$

Moleculele ADN au aproximativ 10 trepte pe rând. Treptele, lungi de aproximativ 11Å, sunt formate de perechile de baze și sunt legate între ele. Datorită asocierii de baze specifice, se poate realiza o copie exactă complementară a fiecărui element, la fel ca o imprimare fotografică realizată dintr-un material negativ. În acest fel, secvența bazelor din ADN este conservată exact și complet. Aceste procese sunt importante în materialul genetic și în sinteza proteinelor.

BUJASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

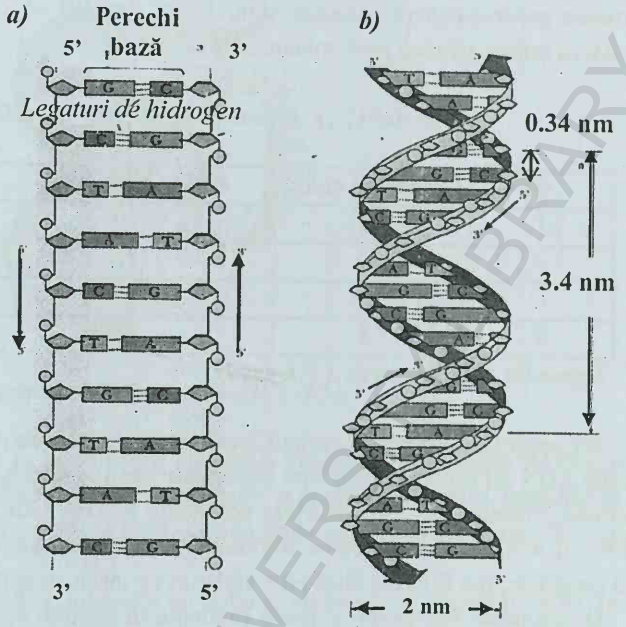


Figura V.3.1 Modelul structurii ADN.
a) model de scară nerăsucită a ADN (cu două lanțuri polinucleotidice antiparalerale și complementare);
b) modelul scării răsucite a ADN-ului (aceleași aranjamente ale nucleotidelor) (43)

Datele din difractogramele cu raze X au indicat că helixul ADN ar putea fi rotit cu 180° fără a schimba forma sa, sugerând că este un dublu helix cu cele două lanțuri care rulează în direcții opuse. S-a demonstrat că rotația unui dublu helix este în concordanță cu datele din difracția cu raze X, dar rotația unui singur helix sau triplu helix nu este.

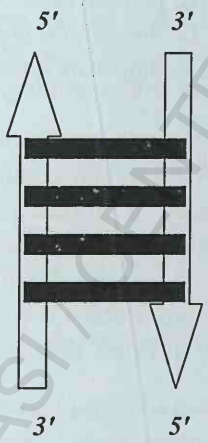


Figura V.3.2. Reprezentare schematică a structurii antiparalele a ADN-ului.
Cele două catene duble, una care rulează de la 5 'la 3', iar cealaltă de la 3 'la 5'. Liniile dintre ele reprezintă ***legăturile de hidrogen*** *dintre baze.*

Cele două lanțuri polinucleotidice din ADN sunt de obicei găsite în forma unei *spirale duble drepte*: bazele celor două catene sunt situate în centrul moleculei, iar coloanele vertebrale ale fosfatului glucidic - la exterior. Această structură dublu-catenară depinde de secvența de baze dintr-o catenă care este complementară celei din cealaltă.

Cele două lanțuri anti-paralele ale ADN-ului *sunt ținute împreună de forțele slabe de legare a hidrogenului dintre bazele complementare și de interacțiunile hidrofobe dintre perechile de bază adiacente*; din cauza acestor forțe slabe, ele se pot desface ușor până la

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

conformația mono-catenară. Acestea sunt, totuși, imediat asociate din nou, astfel încât molecula, ca întreg, rămâne predominant dublu catenară.

Tabelul V.3.1. Forme caracteristice ale ADN

ADN	*direcție helix*	*rotiri helix*	*diametru helix*
B	D	10	19
A	D	11	23
C	D	9.3	19
Z	S	12	18

Legendă: D = dextrogir, S = levogir.

Secvența poate provoca variații locale semnificative în structura conformațională a moleculei ADN iar aceste variații sunt importante pentru interacțiunile specifice dintre ADN și diferitele proteine. *In vivo*, structura secundară a ADN-ului este un dublu helix numit formă ***B*** sau ***B-ADN***, deși structura sa tridimensională poate varia. În condiții modificate, în special umiditate, pot fi găsite două alte ADN-uri cu mâna dreaptă: formulele ***A*** și ***C***.

Denaturarea ADN-ului se poate întâmpla în condiții speciale care sunt folosite în unele metode de analiză. La o temperatură de aproximativ 90°C, va fi suficientă energie pentru a denatura complet ADN-ul. Această denaturare poate fi urmată de o metodă de absorbție spectrofotometrică, care măsoară absorbanța luminii la 260 nm, aceasta fiind mai mare în cazul bazelor mai puțin restricționate ale moleculei mono-catenare decât în cazul celor cu două catene; absorbția ADN-ului la 260 nm crește, pe măsură ce ADN-ul devine denaturat, acest fenomen fiind denumit *efect hipercromic*. La temperaturi mai mici de 70°C se întâmplă o denaturare mai redusă a ADN-ului; creșterea suplimentară a temperaturii duce la o creștere rapidă a denaturării.

Temperatura la care se *topește* 50% din ADN se numește *temperatura de topire* și depinde de natura ADN, fiind cea mai mare pentru acele ADN-uri care conțin cea mai mare proporție de citozină și guanină. Această temperatură poate fi utilizată pentru a estima procentul de ***C + G*** dintr-o probă de ADN. Această relație între *temperatura de topire* și procentul ***C + G*** și nu bazele ***A + T*** poate fi explicată prin numărul diferit de legături de hidrogen (între ***C*** și ***G*** există trei legături de hidrogen - care necesită o energie mai mare pentru a le separa sau denatura - în timp ce între **A** și **T** există doar două legături de hidrogen).

Structura ARN

Moleculele ARN sunt, de asemenea, polinucleotide cu zahăr-fosfat și patru tipuri de baze, ca și în ADN. Principalele diferențe între ARN și ADN sunt:

- moleculele ARN sunt monocatenare
- zahărul din ARN este un zahăr de riboză (spre deosebire de deoxi-riboză) și are un -OH la poziția 2' C (zaharurile ADN au -H la acea poziție)
- timina (T) în ADN este înlocuită cu uracil (U) în ARN. T are o grupare metil (-CH3) în loc de atomul H din U.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

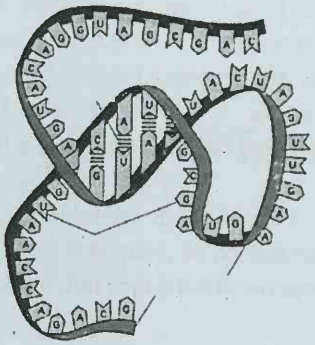


Figura V.3.2. Structura ARN (124)

Moleculele ARN nu au o structură elicoidală regulată, ca în cazul ADN-ului. În schimb, acestea pot forma structuri tridimensionale complicate, în care lanțurile se pot învârti înapoi și să formeze perechi de bază din regiunile auto-complementare de-a lungul lanțului.

Cea mai mare parte a ARN-ului este un polimer alternativ de riboză și fosfat, în care grupările fosfodiesterice stabilesc punți de atomi de O3' și O5' din riboze consecutive.

O mare varietate de modificări de bază pot fi, de asemenea, observate în moleculele ARN care apar în mod natural. Astfel, adenina realizează adesea perechi cu timina sau uracilul prin intermediul a două legături de hidrogen, iar guanina se combină cu citozina prin trei legături de hidrogen. Dacă acestea sunt respectate, rezultă o structură dublu elicoidală stabilă. Importanța acestui fapt constă în aceea că, dacă secvența de pe un versant este cunoscută, cealaltă pe celalalt versant poate fi dedus. Lanțurile sunt concepute ca plus (+) și minus (-); în timpul transcrierii, se sintetizează o moleculă de ARN complementară benzii minus (-).

În interiorul celulelor, trei tipuri de ARN sunt implicate direct în sinteza proteinelor care trebuie să aibă o ordine corectă a aminoacizilor, dictată de secvențele nucleotidice din ADN: *ARN ribozomal (ARN), ARN-ul mesager (ARNm) și ARN transfer (ARNt).*

S-a demonstrat totuși că există și alte tipuri de ARN prezente în cantități mai mici, inclusiv *ARN mic nuclear (Small Nuclear RNA), ARN mic nucleolar (Small Nucleolar RNA) și ARN de particule de recunoaștere a semnalului 4.5S (SRP)*. Noi specii de ARN continuă să fie identificate.

ARN mesager (mRNA) poate varia de la 300 nucleotide la 7000 de nucleotide, în funcție de mărimea și de numărul de proteine pentru care codifică. El acționează ca un șablon pentru sinteza proteinelor și are aceeași secvență de baze (citite de la capătul 5' la capătul 3') ca șir de ADN care are secvența de gene.

Moleculele de transfer ale ARN (tRNA) sunt în intervalul ~ 70-90 nucleotide. Ele au o greutate moleculară de aproximativ 25.000 și au o constantă de sedimentare de aproximativ 4 unități Svedberg. Moleculele ARNc sunt atașate covalent la aminoacidul corespunzător la un capăt, iar la celălalt capăt au o secvență triplă (numită anti-codon) care este complementară codonului triplet de pe mARN, iar ARN-ul ribozomal (ARN-r) constituie o parte integrantă a ribozomului.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VI. BIOFIZICA APEI

VI.1. Molecula de apă
VI.2. Structura apei: gheaţa şi apa lichidă
VI.3. Proprietăţile apei şi particularităţile acestora
VI.4. Distribuţia apei în organismul viu
VI.5. Disocierea apei

VI.1. Molecula de apă

Vi se pare că oricine are cunoştinţe despre acest subiect? Dar despre *caracteristicile biofizice* ale moleculei ce ştiţi?

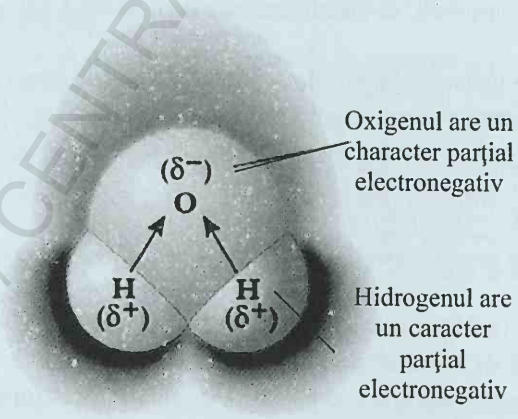


Figura VI.1.1. Caracterul de dipol al moleculei de apă
'δ' este simbolul sarcinii parţiale (107)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Apa este o moleculă alcătuită din trei atomi (doi atomi de hidrogen şi un atom de oxigen), prezintă două legături covalente **O - H** care formează un unghi de aproximativ **104°C**. Ca urmare a numărului de electroni ai oxigenului (în comparaţie cu un singur electron al atomului de hidrogen) legătura covalentă **O - H** are un caracter parţial ionic (circa 40%); hidrogenul devene uşor pozitiv şi oxigenul devene uşor negativ, astfel încât se poate spune că molecula de apa este un **dipol.**

Caracterul de dipol al moleculei de apă are o mare importanţă pentru explicarea proprietăţilor particulare apă. În primul rând, dă posibilitatea existenţei **punţilor de hidrogen** intermoleculare; **aceasta este cea mai importantă caracteristică a moleculei de apă.**

Legătura de hidrogen:

$$X_1\text{-}H^+ \cdots\cdots\cdots\cdots X_2^-$$

- Reprezintă o interacţiune dipol - dipol particulară;
- Deoarece atomii sunt mai apropriaţi decât în interacţiunile electrostatice clasice, legătura de hidrogen este mai puţin decât o legătură covalentă dar mai mult decât una electrostatică;
- Energia este considerabil mai mare decât teoretic: 12,2 kcal / mol apă în comparaţie cu 2-6 kcal teoretic;

În concluzie:

- ➢ definesc distanţe interatomice (27,6 nm în apă) şi unghiuri specifice cu alte legături, favorizând aranjamente moleculare speciale (ex.: aranjarea tetraedrică a moleculelor de apă)
- ➢ are o semnificaţie specială în unele molecule

VI.2. Structura apei: gheaţa şi apa lichidă

Structura apei diferă în diferite stări de agregare, cauza fiind aranjarea mai mult sau mai puţin împachetată şi rigidă a moleculelor.

✓ ***Structura gheţei***

În stare de agregare solidă – gheaţa - moleculele de apă sunt aranjate tetraedric, astfel încât fiecare moleculă formează patru legaturi de hidrogen cu alte molecule, sugerând un aranjament în formă de piramidă.

Legăturile de hidrogen sunt foarte stabile (energia lor fiind, în gheaţă, foarte mare: 10 kcal / mol apă). Interiorul "piramidei" este gol, rămânând multe astfel de spaţii structurate, goale. Din acest motiv, apa este numită "apă cu grad înalt de structurare" (apă înalt structurată) şi densitatea sa este foarte scăzută (mai mică decât cea a apei lichide).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

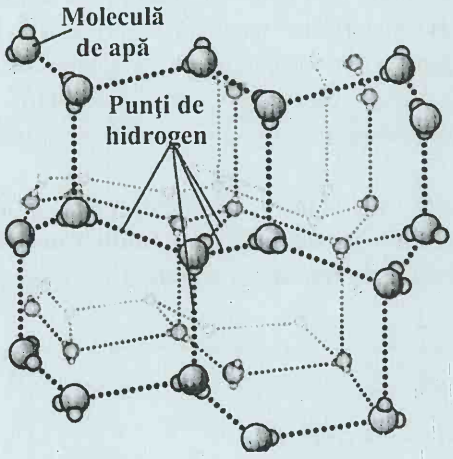


Figure VI.2.1. Structura gheţei: fiecare moleculă de apă formează punţi de hidrogen cu alte patru molecule (124)

✓ *Apa lichidă*

În această stare de agregare apa este numită "apă local structurată", moleculele fiind aranjate fie în configuraţie tetraedrică, fie în clatraţi. Deoarece legăturile de hidrogen sunt tot timpul rupte şi reformate, există un amestec de monomeri, dimeri, tetrameri, octameri ... etc, asocierea predominantă fiind dependentă de temperatură. Cele mai stabile asocieri ale moleculelor de apă, care există, de asemenea, şi în stare gazoasă, sunt *dimerii*.

Table VI.2.1. Caracteristici structurale importante ale apei în relaţie cu temperatura

Temperatura	*Caracteristica structurală*
>0°C (temperaturi pozitive joase)	- structură cvasicristalină (15% legături de hidrogen rupte) - $\eta(0^\circ C) = 1{,}79 \times 10^{-3}$
Temperaturi înalte	- monomeri + dimeri
40°C	- 50% din legăturile de hidrogen sunt rupte
35 - 41°C	- fără structură microcristalină (viscozitatea scade, $\eta(37^\circ C) = 0{,}69 \times 10^{-3}$) - număr mare de dimeri - reactivitate chimică mare

Variaţia particulară a densităţii apei cu temperatura

Topirea gheţii are loc cu ruperea unor legaturi de hidrogen, formându-se, astfel, moleculele de apă "libere"; aceste molecule, care se deplasează prin agitaţie termică, intră in interiorul "piramidelor", astfel încât densitatea apei creşte, fiind maximă la 4°C. După această temperatură, datorită creşterii agitaţiei termice a moleculelor cu temperatura, densitatea apei scade.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VI.3. Proprietăţile apei şi particularităţile acestora

Apa prezintă o serie de particularităţi în privinţa proprietăţilor sale:

- **Punct de topire**
- **Punct de fierbere**
- **Căldură molară de vaporizare**
- **Capacitate calorică specifică**
- **Tensiune superficială**
- **Constantă dielectrică**
- **Creştere în volum (şi scădere în densitate) la congelare**
- **Moleculă polară**
- **Mare afinitate pentru alte molecule**

Punct de topire: 0°C
Punct de fierbere: 100°C
Densitatea maxima la 4°C: 1g/cm^3
Tensiunea superficiala la 20°C: 72,75 mJ/m^2
Masa moleculara: 18,01g/mol

- **Punctele de topire şi de fierbere**

Între alţi compuşi cu structură chimică similară sau numărul total de electroni pe moleculă similar, apa are cele mai înalte puncte de topire şi de fierbere. Acest fapt, care presupune că este mult mai dificil să se schimbe forma agregare pentru apă în comparaţie cu orice alt compus similar, este în relaţie cu structura moleculei de apă şi prezenţa legăturilor de hidrogen, a numărului mare de legături de hidrogen (de obicei, două per moleculă).

- **Căldură molară de vaporizare a apei**

Poate fi definită ca fiind căldura necesară pentru vaporizarea unui mol de substanţă. De obicei aceasta scade cu scăderea greutăţii moleculare, însă apa face o excepţie, căldura molară de vaporizare a apei fiind mai mare (9,75 kcal/mol) decât cea calculată teoretic.

Această proprietate are o importanţă deosebită pentru organismele vii în mecanismul de disipare a căldurii: o cantitate mică de apă disipă o cantitate considerabilă de căldură (de exemplu, 1g de apă disipă mai mult de 500cal de căldură).

- **Capacitate calorică specifică a apei**

Reprezintă numărul de calorii de căldură necesare pentru a ridica temperatura unui gram de apă cu un grad Celsius. Capacitatea calorică ridicată a apei se explică astfel: pentru a ridica temperatura apei, energia este consumată nu numai pentru creşterea energiei cinetice a moleculelor, ci şi pentru ruperea legăturilor de hidrogen.

Deci, chiar dacă toate procesele metabolice ale vieţii generează continuu de căldură, există doar o creştere minimă a temperaturii corpului (pentru că mai mult de 70% din organism viu înseamnă apă). Datorita acestei proprietati, organismele vii, compuse în cea mai mare parte din apa, pot sa îşi regleze temperatura corpului între 36,1 si 37,8°C. De vreme ce capacitatea apei de a acumula caldura este neobişnuit de mare, chiar şi în condiţiile în care temperatura exterioară se modifică, schimbul de căldura între corp şi mediu nu determină diferenţe majore în temperatura organismului.

Apa reuşeşte să transporte caldura mai uşor decât oricare alt lichid cu excepţia mercurului, ceea ce face ca temperatura sa fie aproximativ aceeaşi în diferitele părţi ale

BCU "IOAN SLAVICI" UNIVERSITY LIBRARY

organismului. Aceeaşi proprietate a apei este responsabilă şi de menţinerea relativ uniformă a temperaturii pe verticală, în oceane şi lacuri.

- **Tensiune superficială**

Coeficientul de tensiune superficială al apei este mai mare decât cel aşteptat. Acest lucru poate fi în relaţie cu legăturile intermoleculare dintre moleculele de apă şi este strâns legat de căldura molară de vaporizare, deoarece o creştere a ariei suprafeţei necesită ruperea unui număr de legături, cum se întâmplă şi în cazul procesului de vaporizare.

Fenomenul are o importanţă deosebită pentru formarea filmelor de lipide în membranele biologice. Această proprietatea explică şi de ce insectele pot merge pe apă sau cum se formeaza picăturile şi de ce apa se poate ridica prin trunchiurile copacilor, sfidând legea gravitaţiei.

- **Constanta dielectrică**

Constanta dielectrică mare a apei este în relaţie cu existenţa caracterului de dipol al moleculei de apă.

Orientarea dipolilor reduce forţele dintre molecule şi face posibilă organizarea moleculelor de apă în dipoli mai mari.

Aceasta explică observaţia că apa este un solvent foarte eficient pentru substanţele ionice şi este importantă pentru organismele vii, deoarece cele mai multe reacţii biochimice au loc în soluţii apoase, apa fiind solventul în toate fluidele corpului nostru.

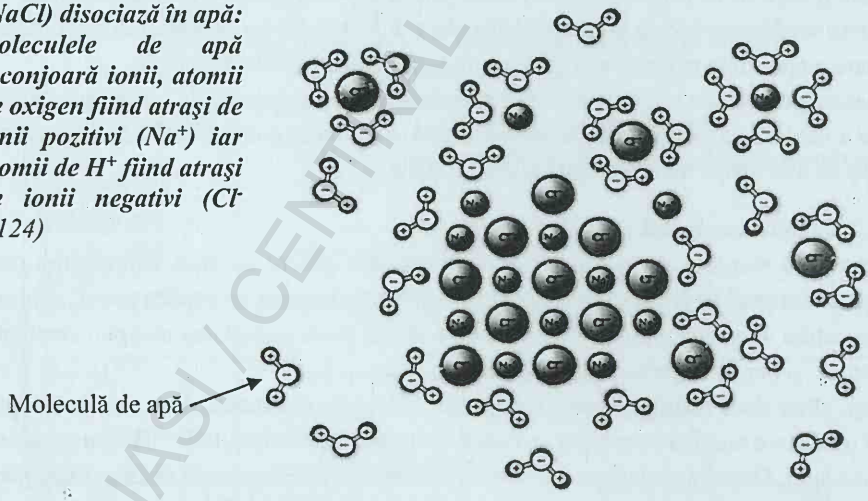


Figura VI.3.1. Sarea (NaCl) disociază în apă: moleculele de apă înconjoară ionii, atomii de oxigen fiind atraşi de ionii pozitivi (Na^+) iar atomii de H^+ fiind atraşi de ionii negativi (Cl^-)(124)

- **Creştere în volum şi scădere a densităţii prin îngheţare**

Apa are proprietatea specială de a avea o densitate mai mică după îngheţare, în relaţie cu structura gheţii (explicată anterior). Densitatea maximă a apei este la 4°C; continuând să scadă temperatura, gheaţa are o densitate de aproximativ 9/10 faţă de apă. Sub, dar si peste temperatura de 4°C, apa are o densitate mai redusă. Acesta este cauza pentru care, de exemplu, mările şi lacurile îngheaţă de la suprafaţă în jos, iar gheaţa pluteşte pe apă. Deoarece gheaţa

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

este mai puțin densă decât apa lichidă, iar apa ingheață de la suprafață în jos, a fost posibil ca și în perioada glaciară viața să persiste în adâncurile oceanelor, aceasta fiind izolată de frig. Dacă acest comportament al apei ni se pare banal pentru ca ne-am obișnuit cu el, merită menționat faptul ca aproape toate celelate substanțe chimice sunt mai dense în stare solidă și ingheață de la adâncime spre suprafață.

- **Coeficient de viscozitate**

O altă proprietate paradoxală a apei este viscozitatea: coeficientul de viscozitate este mai mic decât cel așteptat, în relație cu structura "discontinuă" a apei lichide, prin ruperea și formarea continuă de legături de hidrogen în stare lichidă.

Tabelul VI.3.1. Valori ale unor parametri ai apei (în comparație cu alcoolul metilic)

parametru / *lichidul*	*Căldura molară de vaporizare*	*Capacitate calorică specifică*	*Tensiune superficială*	*Constantă dielectrică*	*Viscozitate*
Apă - 0°C	595,9	1,009	75,64	88	17,921
-100°C	539,6	1,006	58,85	48	2,838
Alcool metilic	262,8	0,600	22,6	33,1	5,93

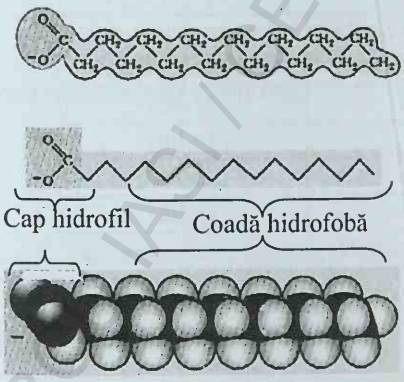
- **Molecule polare cu afinitate crescută față de alte molecule**

Prin caracterul său polar, molecula de apă are mare afinitate pentru alte molecule polare sau cu un caracter parțial polar (caracter numit *hidrofil*).

O consecință a acestei proprietăți este aranjarea moleculelor amfipatice în mediul apos: partea hidrofilă, polară, se orientează spre apă iar partea hidrofobă, nepolară evită vecinătatea apei, orientându-se spre interiorul acestor aranjamente sferice, denumite *micele*.

Acest aranjament și aceste interacțiuni electrostatice apă-molecule amfipatice au rol și ăn aranjarea fosfolipidelor în biomembrane (capul hidrofil spre exterior și cozile hodrofobe spre interiorul membranei).

(a) Acidul palmitic
Model structural al unei molecule amfipatice



(b) Micelă

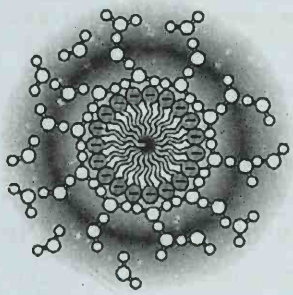


Figura VI.3.2. Moleculele amfipatice și aranjarea lor în soluție apoasă (a) molecule amfipatice, cu un cap hidrofil și o coadă hidrofobă; (b) micelă, formată deoarece moleculele de apă se grupează în jurul capului hidrofil al moleculor amfipatice iar cozile formează o regiune hidrofobă centrală (107)

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

VI.4. Distribuţia apei în ţesuturile vii

Distribuţia apei în organismul viu depinde de vârstă, sex şi activitatea metabolică a ţesutului, aceasta fiind exemplificată în diagrama următoare:

Ţesut	*Activitate metabolică*	*Apă %*
păr		4
dinţi		9
adipocite (grăsime)		30
ficat		75
muşchi		76
rinichi		76
inimă		77
nervi		85
plasmă		93
embrion		97

În organism, apa poate fi clasificată în apă intracelulară si extracelulară (care poate fi interstiţială sau extravasculară şi intravasculară), tisulară şi intracavitară (ex. LCR), "liberă" şi "legată" (sau structurată).

Apa intracelulară este un mediu de dispersie, participă la reacţii de hidroliză, este un produs final al unor reacţii de oxidare sau de condensare; 5-10% reprezintă apa structurată ("apa legată"): aceasta rămâne şi după deshidratare, nu se congelează (nici la -20°C) şi nu poate fi transferată prin osmoză.

Tabelul IV.4.1. Distribuţia apei în organism

Apa din organism	*% din greutate corporală*	*% din apa totală din organism*	*Volum pentru un adult de 70 kg*
Apă extracelulară	20%	33%	42 litri
Plasmă	5%	8%	14 litri
Lichid interstiţial	15%	25%	3,5 litri
Apă intracelulară	40%	67%	28 litri

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VI.5. Disocierea apei

Ca urmare a caracterului de dipol, apa există în două forme ionizate: ionul hidronium şi ionul hidroxil.

$$H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^-$$
$$H_2O + H_2O \leftrightarrow H_3O^+ + OH^-$$

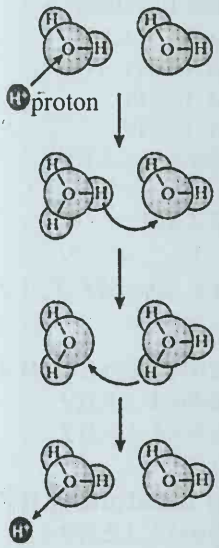


Figure VI.4.1.
Un proton poate oscila între două molecule de apă legate prin punţi de hidrogen

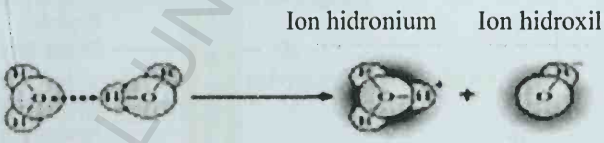


Figura VI.4.2. Un proton poate sări de la o moleculă de apă la alta, formând un ion hidronium (H_3O^+) sau un ion hidroxil (OH^-) – (18)

Fenomenele sunt reversibile (ca urmare a mobilităţii protonilor). La echilibru se poate scrie (constanta de echilibru):

$$K_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$$

Concentraţia de ioni H_3O^+ (sau H^+) şi ioni OH^-, la 25°C, este de aproximativ 10^{-7} molar; se defineşte noţiunea de pH ca fiind logaritmul cu semn negativ al concentraţiei ionilor de hidrogen:

$$pH = -\log[H^+] = \log\frac{1}{[H^+]}$$

Valoarea pH = 7,0 la 25°C, în apă pură, reprezintă *pH-ul neutru.*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lichidele organismului au pH diferit, după cum se observă și din diagrama următoare:

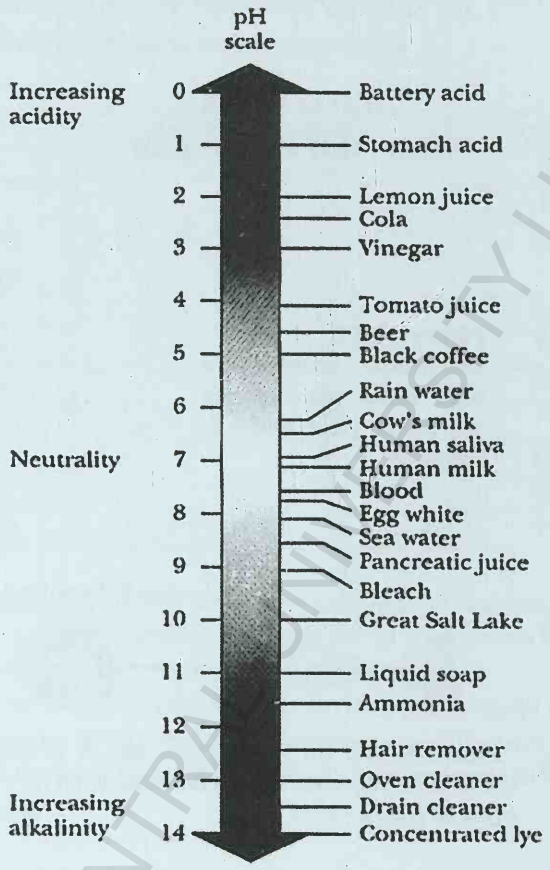


Figura VI.4.3. Scala de pH, cu menționarea ph-ului unor soluții cunoscute (18)

Ca o consecință a structurii și a proprietăților sale particulare, apa are multe roluri în biosisteme, fiind un solvent universal și un bun mediu de suspensie, asigură protecție mecanică pentru anumite structuri anatomice, un exemplu fiind creierul; de asemenea, reprezintă un mediu de transport, prin sânge și alte fluide ale corpului, și ia parte la o mulțime de procese fiziologice în organismele vii.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII. BIOFIZICA BIOMEMBRANELOR

VII.1. Biomembrane: definiție, tipuri, roluri esențiale

VII.2. Compoziția biomembranei și caracteristicile biofizice ale moleculelor componente

VII.2.1. Lipide membranare

VII.2.1.1. Compoziția generală; proprietăți biofizice

VII.2.1.2. Organizarea lipidică: conceptul de bistrat lipidic

VII.2.1.3. Fluiditatea membranară (microviscozitatea)

VII.2.2. Proteine membranare

VII.2.2.1. Compoziția generală; proprietăți biofizice

VII.2.2.2. Organizarea proteinelor: dispoziția în bistratul lipidic

VII.3. Modele și metode în studiul biomembranelor

VII.4. Arhitectura supramoleculară a membranelor celulare

VII.4.1. Evoluția modelelor biofizice

VII.4.2. Modelul „mozaicului fluid"

VII.5. Biofizica transportului transmembranar

VII.5.1. Clasificarea biomembranelor în funcție de permeabilitate

VII.5.2. Clasificarea proceselor de transport transmembranar

VII.5.3. Transportul pasiv

VII.5.3.1. Difuzia simplă. Legea lui Fick

VII.5.3.2. Difuzia facilitată: canale ionice

VII.5.3.2.1. Ionofori

VII.5.3.2.2. Metoda „patch-clamp" pentru studiul canalelor ionice

VII.5.3.2.3. Proprietățile canalelor ionice

VII.5.3.3. Difuzia facilitată: transportori membranari

VII.5.3.4. Osmoza: bazele mecanismelor moleculare

VII.5.3.5. Echilibrul Donnan

VII.5.4. Transportul activ

VII.5.4.1. Pompele ionice

VII.5.4.2. Transportul activ secundar

VII.5.4.3. Translocarea de grup

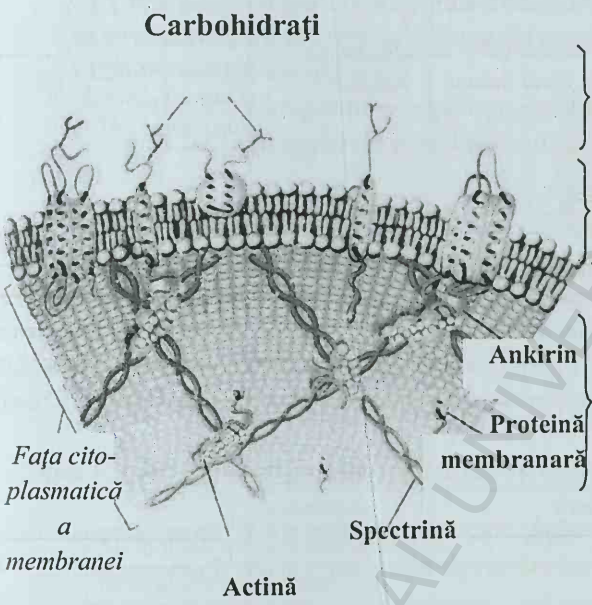
BCU "VICTOR BABEȘ" UNIVERSITY LIBRARY

VII.6. Teoria comunicării intercelulare

VII.6.1. Componentele unui sistem de comunicare intercelulară
VII.6.2. Modalitățile principale de transmitere a informației
VII.6.3. Clasificare și caracteristicile generale ale receptorilor celulari
VII.6.4. Receptori membranari
VII.6.4.1. Structura moleculară generală a receptorilor membranari
VII.6.4.2. Caracteristicile funcționale generale ale receptorilor membranari
VII.6.4.3. Clasificarea receptorilor membranari
VII.6.4.4. Receptori asociați cu proteina G
VII.6.4.5. Receptori asociați cu mesageri secundari
VII.6.4.6. Receptori cu activitate protein-kinazică intrinsecă
VII.6.4.7. Receptori asociați canalelor ionice
VII.6.4.8. Receptori de internalizare a liganzilor
VII.6.5. Receptori intracelulari

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.1. Biomembrane: definiţie, tipuri, roluri esenţiale



Complexul de suprafaţă celulară (Tobin, Morell, 107)

În prezent este acceptat faptul că orice celulă este delimitată la exterior de un complex molecular structural şi funcţional:

(4) ***Membrana plasmatică (1),*** *care va fi studiată aici, este doar un element constitutiv al acestui* ***complex de suprafaţă celulară.***

(3) *Datorită funcţiilor lor*

(1) *diverse, esenţiale pentru viaţă, membranele biologice sunt, însă, unul dintre cele mai studiate biosisteme.*

(2) *Toate celelalte elemente constituiente:* ***citoscheletul (2), glicocalixul (3), matricea extracelulară (4)*** *vor fi studiate la biologie celulară.*

Din punct de vedere molecular, membranele celulare reprezintă entităţi stucturale şi funcţionale deosebit de diverse, unele dintre acestea nefiind încă înţelese în întreaga lor complexitate. Totuşi, acestea au câteva caracteristici comune esenţiale:

- sunt organizate sub formă de straturi moleculare cu o grosime de 5-7 nm;
- sunt alcătuite în principal din: lipide, proteine şi carbohidraţi (incluzând glicoproteinele şi glicolipidele), proporţia acestora variind în funcţie de tipul de membrană;
- sunt ansambluri moleculare asociate prin legături de tip electrostatic (noncovalent);
- din punct de vedere termodinamic, sunt sisteme stabile;
- întotdeuna sunt metabolic active.

Biomembranele au roluri importante în organism: realizează adevarate bariere, separând mediul intracelular de cel extracelular; sunt bariere antientropice; asigură o înaltă permeabilitate selectivă prin intermediul canalelor, a pompelor ionice sau a receptorilor (aspect foarte important în menţinerea volumului celular, a pH-lui intracelular, a compoziţiei ionice, excreţiei moleculelor toxice sau asigurarea excitabilităţii); au rol în comunicarea intercelulară;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pot fi sediul de sinteză al unor molecule.

În relație cu localizarea la nivel celular există două mari tipuri de biomembrane:
- biomembrana externă, denumită și plasmalemă sau membrana citoplasmatică;
- biomembranele interne (mitocondrială, reticulum endoplasmatic, nucleară...)

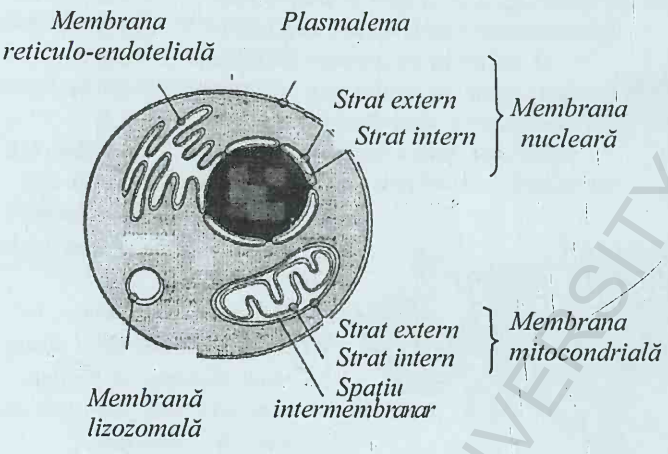


Figura VII.1.1. Tipuri diferite de biomembrane *(Darnell, Lodish, Baltimore, 26)*

Membrana celulară de suprafață, numită și *citoplasmatică*, sau *membrana limitatoare* sau *protoplast* sau *plasmalemă,* are de obicei aproximativ 5 nm grosime. *Funcțiile sale principale sunt*:
- Reprezintă o delimitare a compartimentului intracelular (citoplasma) de cel extracelular (mediul extern).
- Permite transportul a diferite molecule, fiind selectiv permeabilă. Are o permeabilitate ridicată pentru apă, uree, oxigen, dioxid de carbon, glicerol... dând astfel posibilitatea fenomenelor de excreție sau secreție.
- Este o interfață de transfer a semnalelor chimice sau energetice, permițând astfel celulei sa răspundă stimulilor extracelulari.
- Reprezintă un mediu optim de funcționare a moleculelor (enzime, pompe ionice, receptori) fiind împărțită în domenii metabolice sau funcționale distincte.

În anumite organisme, există de asemenea structuri cu caracter membranar, cum ar fi membranele sinaptice, biomembrane de tip senzorial sau de tip bariera tisulară, cum sunt membrana glomerulară renală sau bariera hemato-encefalică.

BCU MF CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.2. Compoziţia biomembranei şi caracteristicile biofizice ale moleculelor componente

VII.2.1. Lipide membranare
VII.2.1.1. Compoziţie generală; proprietăţi biofizice
VII.2.1.2. Organizarea lipidică: conceptul de bistrat lipidic
VII.2.1.3. Fluiditatea membranară (microviscozitatea)
VII.2.2. Proteine membranare
VII.2.2.1. Compoziţie generală; proprietăţi biofizice
VII.2.2.2. Organizarea proteinelor: dispoziţia în bistratul lipidic

---

Toate biomembranele, celulare sau intracelulare, au aceiaşi constituienţi generali: lipide şi proteine, alături de carbohidraţi, glicoproteine, lipoproteine, ioni şi chiar apă, în proporţii diferite. Chiar dacă constituienţii esenţiali sunt aceiaşi, există diferenţe importante cu privire la raportul proteine : lipide, la raportul dintre diferitele tipuri de lipide şi la distribuţia acestora (asimetrie membranară).

Tabel VII.2.1. Raportul proteine : lipide pentru diferite tipuri de membrane celulare

Membrana	*Raportul proteine : lipide*
Membrana mitocondrială internă	3,6
Reticulum sarcoplasmic	3,0
Escherichia coli	2,8
Bacillus	2,8
Staphyloccocus	2,4
Nucleară (celulă hepatică)	2,0
De suprafaţă (celulă hepatică)	1,5
Eritrocit	1,1
Celulă retiniană tip bastonaş	1,0
Plasmalemă	≈1
Membrană mielinică	0,25

Lipidele şi proteinele (inclusiv glicoproteinele şi lipoproteinele) vor fi discutate separat, în cele ce urmează.

Carbohidraţii sunt prezenţi în cantităţi mici (hexoze, hexozamină, acid sialic, galactoză, galactozamină), fiind ataşaţi covalent de molecule mai mari (proteine sau chiar lipide), la nivelul glicocalixului. Ionii (H^+, Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{++}, Mg^{++}, Fe^{++}, Fe^{+++}, HCO^-) pot fi adsorbiţi pe cele două feţe ale membranei.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.2.1. Lipide membranare

VII.2.1.1. Compoziţie generală; proprietăţi biofizice

Lipidele reprezintă componentele care formează "matricea" membranară, "oceanul" fluid în care plutesc "iceberguri" reprezentate de proteine. Conform modelului actual al membranei, *modelul mozaicului fluid*, lipidele sunt aranjate în dublu strat în membrană.

Există o structură tip a lipidelor membranare: ele sunt formate dintr-un "cap" polar, hidrofilic, şi "cozi" nepolare, hidrofobe, care includ acizi saturaţi şi nesaturaţi a căror prezenţă condiţionează poziţia "cozii": dreaptă, în cazul în care există doar acizi saturaţi sau îndoită (în dreptul dublei legături) când include şi acizi graşi nesaturaţi.

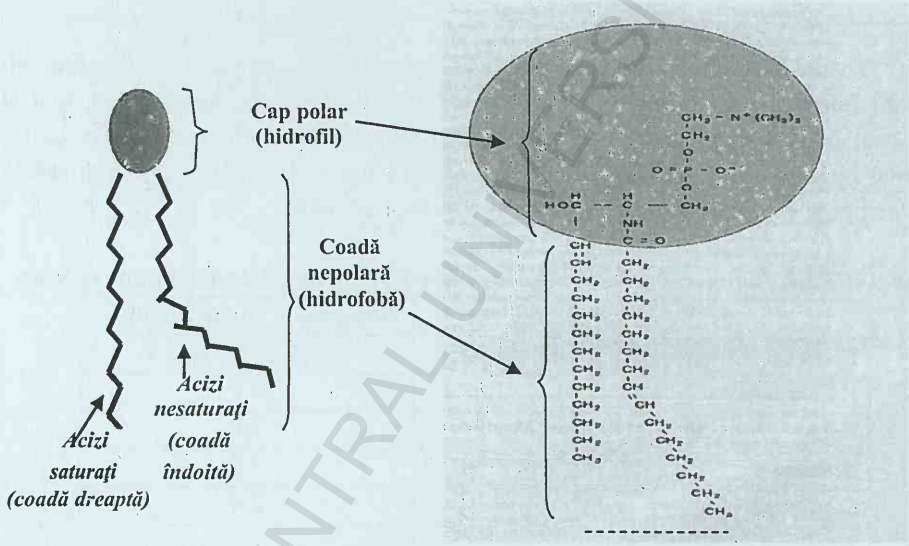


Figura VII.2.1.1.1. Structura schematică a unui fosfolipid membranar (26, modif.)

Membranele sunt alcătuite dintr-un bistrat de lipide amfipatice reprezentate în principal din fosfolipide şi glicolipide. Aproape fără excepţie, în membranele celulelor procariote, fosfolipidele sunt componentele majore, în timp ce la eucariote membranele pot să includă şi un sterol, care la plante este, de obicei, ergosterol iar la animale - colesterol. Sterolul din membrane este neesterificat, deosebindu-se astfel de forma esterificată care există în lipoproteinele serice. Raportul între cantitatea de colesterol şi cea de fosfolipide în membranele celulelor animale poate varia mult, fiind mai mare în membrana plasmatică şi mai mică în membranele intracelulare.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel VII.2.1.1.1. Compoziția procentuală de fosfolipide, glicolipide și colesterol, pentru diferite membrane

Membrana	*% din cantitatea totală de lipide membranare*		
	Glicolipide	*Fosfolipide*	*Colesterol*
Eritrocit uman	11	61	22
Mielină	28	41	22
Mitocondrie din hepatocit de șobolan	<5	80	4
Reticulul endoplasmic	<5	75	8
Protoplast bacterian	urme	80	0
Cloroplast de plantă	80	12	0

Structura lipidelor amfipatice

Majoritatea lipidelor membranare cu caracter amfipatic au la baza structura de diacil-glicerol. În cazul celulelor animale se mai intâlnesc, de asemenea, molecule cu stuctura de bază de tip ceramidă (N-acil-sfingozină). Fosfolipidele sunt fosforilate la gruparea liberă de hidroxil primar (sau la hidroxilul din structura ceramidei) realizând astfel o mare varietate de lipide membranare în funcție de reziduul legat la gruparea fosfat terminală.

În cazul celulelor animale compoziția fosfolipidelor variază în funcție de tipul membranei. De exemplu, sfingomielina este componentul major al membranei plasmatice în timp ce difosfatidil-glicerolul se regăsește în membrana internă mitocondrială (cardiolipina).

Alte lipide membranare, în funcție de restul de tip carbohidrat legat la hidroxilul primar liber al diacil-glicerolului sau hidroxilul ceramidei formează o varietate de forme de glicolipide.

Membrana celulelor animale poate conține o rețea importantă de glicolipide, de obicei având la bază o structură de tip ceramidă. Lanțurile de carbohidrați pot fi liniare sau ramificate, conținând pe lângă galactoză și glucoză și carbohidrați N- acetilați sau acid sialic (acid N-acetilneuraminic). Cerebrozidele conțin doar resturi de carbohidrați fără sarcini electrice comparativ cu gangliozidele care conțin carbohidrați N-acetilați sau resturi de acid sialic. Toate aceste tipuri de lipide membranare amfipatice (exceptând colesterolul și ergosterolul) conțin două lanțuri lungi de tip acil. În cazul lipidelor pe bază de ceramide aceste lanțuri au invariabil 15 atomi de carbon incluși în molecula de sfingozină.

Cele două tipuri de lanțuri acil sunt esterificate la grupările libere hidroxil ale scheletului de glicerol sau amidifiate la scheletul de ceramide. Lanțurile cuprind de obicei între 12 și 14 atomi de carbon, pot prezenta una, două sau patru legaturi duble. Unul dintre cele mai importante reziduri acil este reprezentat de arahidonat (proveniență din acidul arahidonic) care conține patru legături duble.

Lipidele eterificate, reprezintă o altă clasă de fosfolipide. Cele mai multe membrane conțin de obicei un procent redus de *lipide eterificate*, dar pot fi componente majoritare în anumite membrane. De exemplu, în membrana reticulului endoplasmatic la câine reprezintă aproximativ 53% din fosfolipidele membranare sau în

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

reticulum endoplasmatic al celulelor osoase -70% din etanolamina din rândul fosfolipidelor sunt lipide eterificate. De asemenea, membrana macrofagelor și a trombocitelor este bogată în aceste tipuri de lipide.

VII.2.1.2. Organizarea lipidelor: conceptul de bistrat lipidic

Conceptul conform căruia lipidele membranare sunt aranjate în bistrat lipidic a fost confirmat științific. Acest concept a plecat de la observarea organizării lipidelor în bistrat în cazul unui amestec de detergenți și își are originea cu trei secole în urmă, în 1672, când **Robert Hooke** (cel care în 1665 a propus și utilizat termenul de *celulă*) utilizând un microscop primitiv, a observat și descris banalele bule de săpun. Câteva decade mai târziu, **Isaac Newton** a estimat grosimea filmelor de detergenți (echivalent cu bistratul lipidic) la aproximativ 9,5 nm, valoare în deplin acord cu măsuratorile moderne.

De-a lungul timpului, mai multe modele au fost propuse pentru a înțelege mai bine conceptul de bistrat lipidic.

Tabel VII.2.1.2.1. Sisteme de interfețe cu proprietăți de autoansamblare

Sistem	*Interfețe*
Film de detergenți	Aer / apă/ aer
Monostrat	Aer / strat molecular / apă
Multistrat	Aer / strat molecular / apă
Bistrat (lipozomi)	Apă/ strat molecular / apă
Monostrat pe suport de aur	Aer / strat molecular / aur
Suporturi metalice (bistrat lipidic membranar)	Apă / strat molecular / metal

Ca urmare, lipidele sunt aranjate în bistrat, cu partea hidrofilă („capul" polar lipidic) spre exterior și partea hidrofobă („coada" nepolară lipidică) spre interiorul membranei; din acest motiv, putem spune că membrana este *amfipatică*. Bistratul lipidic este impermeabil moleculelor polare (solubile în apă) și permeabil moleculelor nepolare (insolubile în apă) cum ar fi gazele - oxigenul, dioxidul de carbon, azotul, hormonii steroizi sau alte lipide.

Moleculele lipidice pot trece liber prin membrană, rata de difuziune fiind dependentă de coeficientul de partiție ulei-apă. Experimental, s-a demonstrat că bistratul lipidic membranar are proprietățile unui *cristal-lichid* (o stare de tranziție între lichid și cristal). Compoziția lipidică membranară diversă a celor două straturi lipidice poate contribui, probabil, la înțelegerea intervalelor largi corespunzătoare temperaturii de *'topire' (fluidizare)* a membranelor. Tranziția continuă a lipidelor membranare între starea de lichid și cristal duce la formarea tranzitorie a unor domenii membranare, modificând atât structura intimă membranară cât și influențând funcțiile unor componente membranare.

BCUMS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

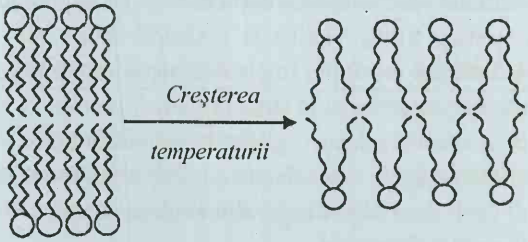


Figura VII.2.1.2.2. Exemplu de modificări de fază induse bistratului lipidic de creşterea temperaturii

Cele mai multe informaţii despre organizarea membranară a lipidelor amfipatice în bistrat au fost obţinute după cercetările care au utilizat în mod particular membranele celulele mamiferelor şi a eritrocitelor umane. Partea centrală reprezintă partea hidrofobă şi conţine lanturile acil ale fosfolipidelor sau glicolipidelor iar partea exterioară este cea hidrofilă şi conţine reziduri fosfodiesterice sau lanţuri glicozil.

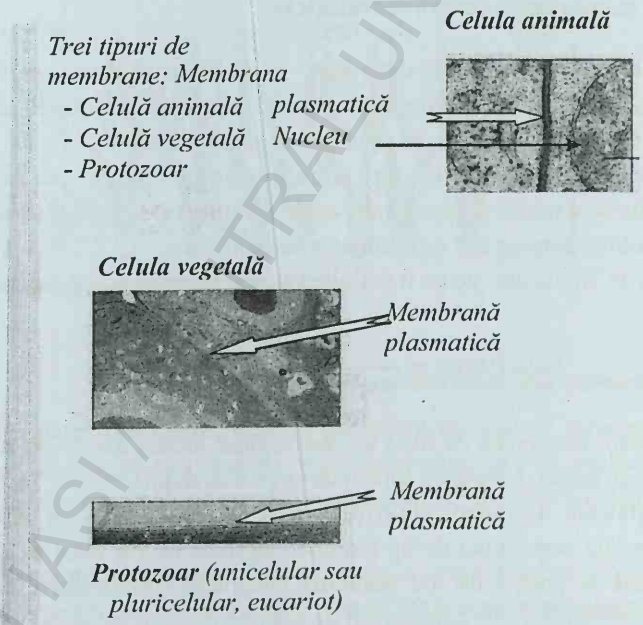


***Figura VII.2.1.2.3. Bistratul lipidic este o structură ce se regaseşte în diferite membrane** (Tobin, Morell, 107)*

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În membrana celulelor animale, fosfolipidele şi glicolipidele sunt distribuite asimetric în cele două straturi. Sfingomielina şi fosfatidil-colina sunt predominante în stratul extern, în timp ce fosfatidil-inozitolul (moleculă implicată în semnalizarea celulară) şi fosfatidil-serina se regăsesc predominant în stratul intern.

Reziduurile glicolipidice (reziduuri glicozil sau carbohidrat) sunt repartizate exclusiv în stratul extern. Membranele intracelulare au de asemenea o distribuţie asimetrică a fosfolipidelor la nivelul celor două feţe, fiind, cel mai probabil, consecinţa mecanismelor prin care aceste molecule au fost sintetizate.

Tabel.VII.2.1.2.2. Distribuţia asimetrică a lipidelor în cele două straturi în cazul eritrocitelor umane (% în fiecare strat)

Tip de lipid	*Strat intern*	*Strat extern*
Sfingomielina	17	83
Fosfatidil colina	26	74
Fosfatidil etanolamina	77	23
Fosfatidil serina	95	<5
Glicolipide	<5	95

VII.2.1.3. Fluiditatea membranară (microviscozitatea)

Prezenţa lipidelor în membrană determină o proprietate fizică esenţială a membranei, numită *fluiditate*. Această proprietate este în relaţie cu mai mulţi parametri fizici şi chimici dintre care, în primul rând, cu tipul de lipide membranare.

Ca urmare a interacţiunilor de tip hidrofil-hidrofob dintre componentele membranare, moleculele au o mişcare permanentă, ceea ce conferă membranei un status de echilibru dinamic - echilibru caracterizat de fluiditatea membranei.

Noţiunea fizică de "fluiditate" poate fi definite ca fiind inversul microviscozităţii:

$$fluiditatea = \frac{1}{viscozitate} = \frac{1}{\eta}$$

Dacă ne imaginăm membrana ca fiind un mediu fluid format din lipide (cu partea hidrofilă spre exterior şi partea hidrofobă spre interiorul bistratului), mediu în care sunt imersate proteine (purtătoare de sarcini electrice), va fi uşor de înţeles că între aceste componente se vor exercita interacţiuni de tip hidrofil-hidrofobe ce vor duce la modificări încontinuu de geometrie şi poziţie dar cu pastrarea integrităţii membranare, explicând, astfel, de ce interiorul membranei este caracterizat de o anumită fluiditate şi exteriorul de o alta.

$$\eta_{membrana} = 0{,}1\ Ns/m^2 = 100 \times \eta_{apa}$$

Viscozitatea membranei este de 100 mai mare decat viscozitatea apei, fiind egală cu aproximativ 0,1 Ns/m^2.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fluiditatea poate fi modificată de o serie de factori care pot fi consideraţi *reglatori naturali:*

Reglatori biochimici:	*Reglatori biofizici:*
- raportul colesterol/fosfolipide	- temperatura
- raportul sfingomielină/lecitină	- pH
- raportul proteine/lipide	- potenţialul membranar
- gradul de nesaturare al acizilor graşi	

Gradul de fluiditate creşte cu gradul de nesaturare al lanţurilor acil şi scade în funcţie de cantitatea de colesterol din membrană. Cu cât sunt mai multe lanţuri nesaturate de tip acil, cu atât temperatura de tranziţie între starea organizată (de *cristal*) şi cea fluidă scade.

Colesterolul restricţionează mobilitatea lanţurilor de acil în imediata apropiere a „capului" hidrofil şi astfel inhibă trecerea în stare cristalină chiar şi sub temperatura de tranziţie.

În condiţii fiziologice (35 - 37°C pentru mamifere) lipidele membranare sunt într-o stare fluidă permiţând lipidelor şi proteinelor să difuzeze în plan lateral în bistrat *(difuzia laterală).*

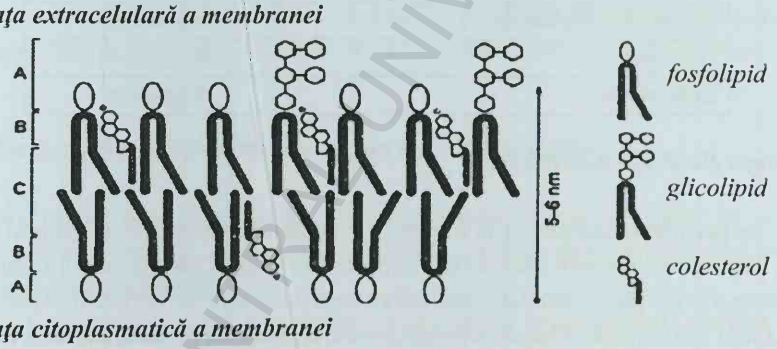


Figura VII.2.1.3.1. Rolul colesterolului din membrană (106)

Fluiditatea membranei este un parametru esenţial ce caracterizează anumite funcţii celulare – biogeneza membranei, microtransportul, exo şi endocitoza, etc. Transportul facilitat sau microvezicular intracelular sunt exemple în care fluiditatea membranară poate fi implicată.

De exemplu, transportul facilitat scade la temperaturi de sub 20°C şi se opreşte la 4°C în cazul unor organisme poikiloterme. Aceste organisme se adaptează la temperaturi scăzute prin modificarea compoziţiei lipidice membranare. Atunci când cantitatea de resturi acil nesaturate este crescută, acestea vor modifica fluiditatea membranei deoarece conformaţia geometrică moleculară va permite un aranjament molecular membranar mai relaxat, ducând la creşterea acesteia. Se poate concluziona că fluiditatea membranei creşte odată cu creşterea proporţiei de resturi acil nesaturate.

BCU IASI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

Un aspect fiziologic important constă în faptul ca există o fluiditate asimetrică la nivelul celor două straturi lipidice membranare dată în principal de compoziția diferită în resturi acil a fosfolipidelor membranare din cele două straturi.

Fluiditatea se modifică în multe stări fiziologice sau patologice.

Tabel VII.2.1.3.1. Exemple de modificări ale fluidității membranare în diferite stări fiziologice sau patologice

Starea fiziologică sau patologică	*Modificare*
Alcoolism cronic	Fluidizare
Obezitate	Fluidizare
Hipoxemie cronică	Fluidizare
Limfom	Fluidizare
Boala de iradiere (X)	Fluidizare
Hipertermie malignă	Fluidizare
Ateroscleroză	Rigidizare
Hipertensiune genetică	Rigidizare
Boli hepatice	Rigidizare
Neoplazii - melanom	Rigidizare
Hepatom	Rigidizare
Imbătrânire	Rigidizare

Măsurarea fluidității membranare

Se pot obține informații în relație cu fluiditatea membrană cu ajutorul mai multor metode, cele mai importante fiind prezentate în tabelul de mai jos. Aceste informații obținute prin metode diferite pot fi similare sau diferite așa cum sunt prezentate în tabel:

Tabel VII.2.1.3.2. Metode utilizate pentru măsurarea fluidității membranare

Metodă	*Informații*
Depolarizarea fluorescenței	Nivel macromolecular, distinge starea fluidă de cea ordonată
Spectroscopia fluorescenței	Dinamica moleculară membranară
RES- Rezonață electronică de spin	Fluiditate mediată paramagnetic (scală temporală $< 10^{-7}$)
Rezonanță statică sau pulsată	Fluiditate (scală temporală $>10^{-5}$ pentru static; $<10^{-5}$ pentru pulsat)
Calorimetrie diferențială	Tranziții de fază și separare
Infrarosu și Raman	Mobilitate intramoleculară
Difracție cu raze X	Tranziții de fază
Microscopie electronică (criofractură)	Separare de faze

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.2.2. Proteine membranare

VII.2.2.1. Compoziție generală; proprietăți biofizice

Toate membranele biologice conțin proteine. Conținutul în proteine variază între 20% până la 70% în funcție de tipul de membrană. Raportul lipide/proteine variază de la 3,6 în membrana internă mitocondrială la 0,25 în membranele bogate în mielină. Pentru cele mai multe celule animale, raportul este de 1, în timp ce plasmalema procariotelor cât și membranele plantelor cu cloroplaste raportul este similar membranelor interne mitocondriale ale mamiferelor. Deoarece proteinele sunt mai dense decât lipidele, membranele cu diferite valori ale raportului proteine/lipide vor avea densități diferite, proprietate ce stă la baza fracționării membranelor prin centrifugare. Multe dintre aceste proteine conțin și lanțuri de carbohidrați. În cazul celulelor mamiferelor, lanțurile de glicoproteine ale gangliozidelor sunt atașate la gruparea amidică printr-un rest de asparagină. Lanțurile au miez și terminații glucidice.

Miezul de carbohidrat conține de obicei o secvență de N-acetilglucozamină- N acetilglucozamină-Manoză-Manoză iar capătul terminal conține galactoză, derivați N-acetilați de glucozamină, galactozamină și acid sialic (acid N- acetilneuramic) acidul sialic este de obicei reziduul terminal, lanțurile de carbohidrați fiind destul de frecvent atașate astfel.

VII.2.2.2. Organizarea proteinelor: dispoziția în bistratul lipidic

Într-o primă clasificare, proteinele membranare se pot clasifica în *proteine transmembranare (integrale)* și *proteine periferice*. Acestea mai sunt numite proteine intrinseci, respectiv extrinseci.

Didactic, proteinele se pot clasifica în 5 clase, fiecare având anumite caracteristici.

Clasa I: proteine periferice, extrinseci

Acestea sunt proteine periferice, legate prin forțe de tip electrostatic de grupările polare ale fosfolipidelor, și, de asemenea, de alte proteine transmembranare.

Ca urmare a poziției membranare, această clasă de proteine poate fi componentă fie a matricei extracelulare fie a citoscheletului. Acestea nu au domenii bine definite cu caracter hidrofob.

Clasa II de proteine este constituită de proteinele ancorate de stucturile lipidice printr-un domeniu hidrofob. Evidențierea certă a acestor proteine este dificil de realizat, dar există date indirecte, de exemplu, toxinele ce interferă cu funcțiile membranare (precum veninul de albină sau melitina) se pare că se inseră parțial pe fața extracelulară a membranei. De asemenea, subunități din familia proteinelor G, pot fi incluse în această categorie.

Clasa III și IV- proteine integrale (transmembranare)

Acest tip de proteine au un rol esențial în membrană, fiind de obicei „porți de intrare" pentru influxul sau efluxul unor molecule. Deci, pot fi de tip receptor (clasa III) sau pompe ionice sau canale ionice (clasa IV). Receptorii pot fi și clasa IV.

Aceste proteine au trei segmente: extramembranar, intramembranar și intracitoplasmatic, fiecare cu funcții diferite. Diferența dintre clasa III și clasa IV este dată de numărul de domenii transmembranare:

- în clasa III există un singur domeniu peptidic hidrofob (ce include 20-30 de aminoacizi) ce traversează bistratul lipidic;
- în clasa IV sunt întotdeauna mai mult multe domenii transmembranare hidrofobe.

Glicoforina din membrana eritrocitară este un exemplu de proteină de clasa III.

Deoarece proteinele transmembranare au o anumită orientare intramembranară, prezintă și o asimetrie funcțională. De exemplu, situsurile de legare ale K^+-lui și situsurile de legare ale ouabainei la Na^+/K^+-ATP-zei sunt localizate pe fața extracelulară, în timp ce situsul de legare al Na^+ și cel de hidroliză a ATP-lui sunt pe fața citoplasmatică.

Domeniile transmembranare sunt selectiv îmbogățite cu aminoacizi non-polari cum ar fi *valina, izoleucina, triptofanul sau fenilalanina*, într-o singură poziție sau mai multe ale lanțului polipeptidic, în timp ce restul lanțurilor (care sunt intra sau extracelular sau apropiate de grupările ionice din bistratul lipidic) sunt îmbogățite cu aminoacizi polari precum *acidul glutamic sau aspartic.*

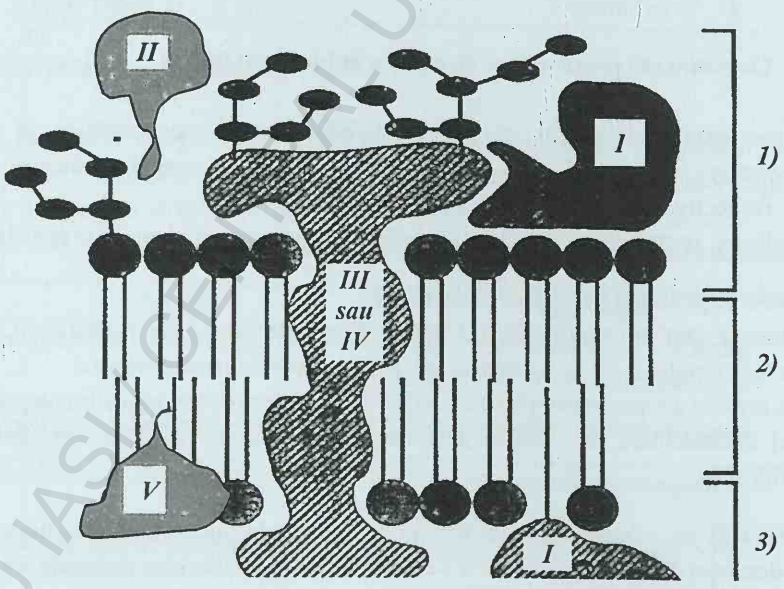


***Figura VII.2.2.2.1. Clasele de proteine membranare** (106), explicații în text; 1) – extracelular, glicocalixul; 2) – intramembranar; 3) – intracitoplasmatic*

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cazul proteinelor de clasă IV, o parte dintre secvențele hidrofobe sunt separate de secvențele polare, secvențe care pot varia ca lungime la nivelul ambelor domenii polare terminale. Lanțul polipeptidic se îndoaie, înainte și înapoi, prin bistratul lipidic, realizând, de exemplu, un canal polar. Numeroși receptori sau pompe ionice fac parte din categoria proteinelor de clasă IV.

S-a observat că, cele mai multe domenii polipeptidice transmembranare au conformație α helix. Acest fapt este explicabil și logic: dacă secvența de aminocizi cu structură secundară α-helix este formată din grupe de 2-3 aminoacizi nonpolari și 2-3 aminoacizi polari, atunci, pe o parte a helixului se vor regasi aminoacizii polari iar pe cealaltă parte, aminoacizii nepolari, ceea ce conferă conformației echilibru cu energie minimă. Un grup de 4 astfel de domenii non-polare poate realiza în mediul hidrofob, membranar, un canal ionic. În situația unei structuri secundare beta-pliat nu s-ar mai putea realiza un astfel de echilibru.

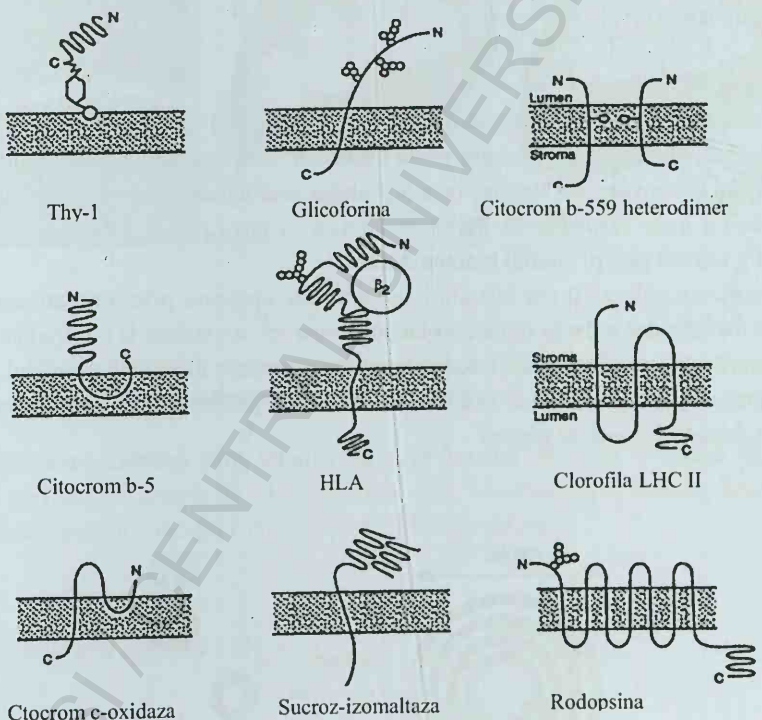


Figura VII.2.2.2.2 Modele de dispoziție a proteinelor membranare (106)

Clasa V

Este reprezentată de proteinele periferice care sunt ancorate în bistratul lipidic prin glicolipide sau acizi grași, cu legături covalente (legături de tip tioester). Un exemplu de proteină din această clasă poate fi *receptorul pentru transferină.*

Multe membrane conțin enzime orientate într-o manieră asimetrică pentru ca situsurile lor catalitice să fie expuse spre mediul extracelular ca urmare a ancorării acestora prin intermediul unui lipid, cum ar fi de exemplu 5'nucleotidaza, fosfataza alcalină sau

aceticolinesteraza.

Semnificația funcțională a glicolipidelor ancorate membranar este puțin cunoscută. Ancorarea poate conferi un grad mai mare de mobilitate laterală, poate permite o eliberare mai rapidă a receptorilor prin intermediul unei fosfolipaze specifice ancorate membranar.

VII.3. Modele și metode în studiul biomembranelor

Pentru studiul biomembranelor s-au utilizat fie modele naturale (eritrocitul fiind cel mai utilizat datorită accesibilității recoltării), fie artificiale (membrane în bistrat lipidic *in vitro* sau lipozomi).

Lipozomi

Multe fosfolipide realizează structura de bistrat în mod spontan, generând membrane experimentale cunoscute sub denumirea de *lipozomi*. Aceştia sunt bistraturi lipidice sferice (închise) sau microvezicule lipidice ce s-au format prin agitare mecanică sau sonicare (cu ultrasunete) a unor suspensii de lipide amfipatice în apă (***Tien***, 2000). Ei reprezintă un model larg utilizat pentru studiul biomembranelor.

Proprietatea de a forma bistraturi lipidice sau lipozomi prin auto-ansamblare este specifică fosfolipidelor dar și multor surfactanți sintetici sau molecule amfipatice.

Tipurile convenționale de lipozomi sunt cunoscute ca fiind multistrat sau strat unic. Dimensiunea lipozomilor este de obicei între 20-50nm, putând ajunge până la 5mm, caz în care sunt denumiți *lipozomi giganți*.

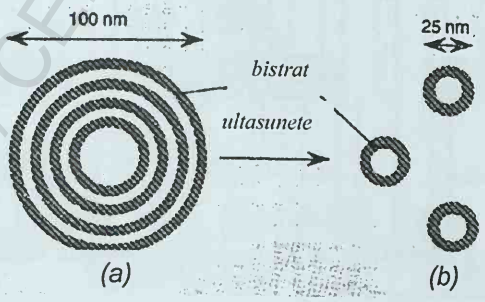


Figura VII.3.1. Lipozom multilamelar (a) și lipozom unilamelar (b) - (106)

Caracteristicele structurale ale lipozomilor au fost investigate prin tehnici de microsopie optică și electronică, difracție cu raze X și spectroscopie RMN. În microscopie optică, lipozomii fosfolipidici se comportă ca substanțe birefringente, depinzând de

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

încărcarea electrică a microveziculei și de forța ionică a fazei apoase.

Metodele utilizate pentru evaluarea structurii membranare și a funcțiilor acestora sunt numeroase, iar dezvoltarea acestora a dus la înțelegerea diferită a caracteristicelor membranare (a se vedea și *Capitolul IV*).

Microscopia electronică

A fost metoda care a dat cele mai valoroase argumente pentru *modelul mozaicului fluid*. În funcție de tipul de microscop electronic, pe eșantioane de 4-6 nm grosime se utilizează microscopia de transmisie, în timp ce tehnica de crio-fractură *(freeze-etching)* permite obținerea de informații de pe regiuni membranare de 0,2 nm.

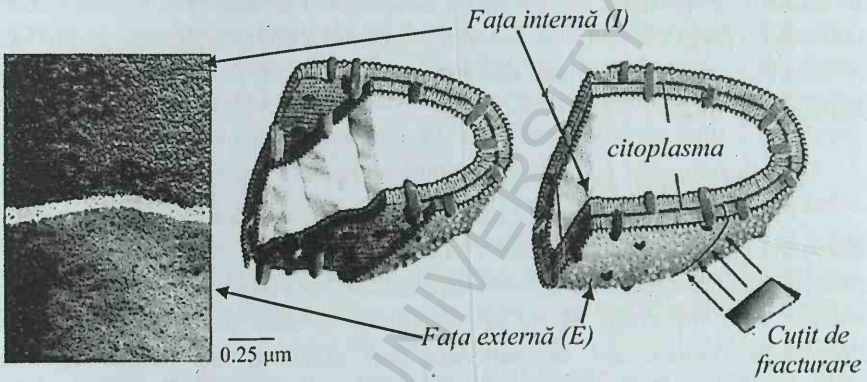


***Figura VII.3.2. Tehnica de criofractură ce evidențiază proteinele transmembranare** (Tobin, Morell, 107)*

Separarea membranei prin tehnica de crio-fractură pune în evidență fața internă hidrofobă și porțiuni din proteinele integrale, care, deci, traversează membrana, aducând astfel informații importante în conceptul structural actual de membrană.

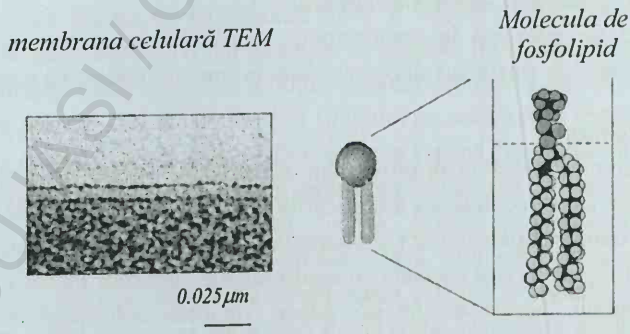


***Figura VII.3.3. Microscopie electronică de transmisie (TEM): imaginea membranei și relația cu fosfolipidele membranare** (Tobin, Morell, 107)*

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Difracția cu raze X

Studiile membranare prin difracție cu raze X au fost realizate în principal pe membrana neuronală, mielinică, fotoreceptorii retinieni cu conuri și membranele tilacoide (la cloroplaste și cianobacterii), ce posedă toate un centru de simetrie și pot fi considerate ca fiind niște *cristale lichide* lipidice neomogene. Densitatea electronică indică faptul că bistratul lipidic este principalul element structural, pe care proteinele îl traversează în totalitate sau nu.

Spectroscopia RMN

Această tehnică poate aduce informații despre membrane la nivel atomic și al fragmentelor moleculare, în termeni de caracteristici structurale și fenomene de dinamică moleculară. Spectrele RMN au fost utilizate pentru a obține informații asupra localizării și mobilității nucleilor importanți din bistratul lipidic, cele mai studiate fiind spectrele de hidrogen sau fosfor (^{31}P).

Spectroscopia de fluorescență

Prin această metodă se pot studia proprietățile biofizice de polaritate și viscozitate a bistratului lipidic și a membranelor. Planul de orientare a sondei și proximitatea acesteia cu moleculele din componența membranelor, care se vor comporta ca donori sau acceptori de energie, aduc informații despre proprietățile structurale și dinamice ale membranelor. Polarizarea flourescenței se realizează prin utilizarea unor sonde de flourescență (difenilhexatriena, DPH), acestea fiind structuri moleculare hidrofobe care de pot lega de partea lipidică a fosfolipidelor. Prin examinarea flourescenței emise, gradul de mobilitate al fosfolipidelor poate fi cuantificat și corelat cu gradul de fluiditate al membranei.

Calorimetria cu scanare diferențială (CSD)

Tranzițiile de fază observate în CSD pot fi corelate cu modificări ale proprietăților biologice ale bistratului lipidic membranar. Informațiile din tehnica de CSD, coroborate cu cele din analizele prin difracție cu raze X, sunt în mod particular utile în caracterizarea stabilității termice a proteinelor membanare.

Dispersia optică rotatorie și dicroismul circular

Aceste 2 tehnici au relevanță în demonstrarea structurii secundare a proteinelor membranare, de tip α-helix, β- pliată sau auto-asamblare în structuri elicoidale aleatorii.

Spectroscopie Raman

Contribuțiile spectroscopiei Raman provin din interpretarea cantitativă moleculară a spectrului de împrăștiere Raman corelat cu modificările rotaționale și vibraționale induse și asociate modificărilor conformaționale intra și intermoleculare. De exemplu, o regiune din spectrul Raman al fosfolipidelor este asociată cu conformațiile lanțurilor hidrocarbonate (-CH_x-) din bistratul lipidic. Aceste spectre pot aduce, simultan, informații atât despre organizarea intramoleculară cât și despre cea intermoleculară (laterală).

Microscopia de forță atomică (MFA)

MFA este una dintre cele mai răspândite tehnici de microscopie pentru studiul membranelor, ca urmare a aplicațiilor multiple, pornind de la examinarea preparatelor organice în secțiuni fine la rezoluție moleculară și până la examinarea celulelor viabile. Prin MFA a putut fi vizualizată auto-asamblarea bistraturilor lipidice fluide în urma lizei structurale a lipozomilor fosfolipidici.

Metode de analiză a dinamicii moleculare

Aceste tehnici permit studiul structurii și comportamentului în timp a biomembranelor prin intermediul simulărilor pe computer a dinamicii moleculare.

În general, se presupune existența unei relații de strânsă interdependență între aspectul structural și cel dinamic, respectiv funcțional, al membranelor. Unul dintre avantajele majore ale analizei dinamicii biomembranelor prin modele teoretice și simulări pe computer este posibilitatea de a obține în intervale foarte scurte de timp o înțelegere explicită a structurii moleculare, a comportamentului dinamic și a statusului energetic la scară atomică. Acest fapt este în contrast cu modelarea experimentală, unde, de exemplu, măsurătorile spectroscopice ne dau informații doar despre procesele care au loc la scara temporală a experimentului. Detaliile fine ale mișcărilor moleculare nu sunt înregistrate dacă cinetica este mai rapidă în comparație cu scara temporală a experimentului. Simulările pe computer ne dau posibilitatea examinării unui singur compus lipidic sau unui agregat mic de lipide, efectul moleculelor din restul bistratului lipidic și a solventului fiind modelate prin forțe aleatorii și disipative, cu introducerea unui potențial de câmp, cu valoare medie. Dacă scopul modelării pe computer este de a urmări cinetica unei singure structuri lipidice, se pot face simulări extinse pe intervale de sute de nanosecunde prin metode stocastice de modelare dinamică.

Un exemplu: studiul topografiei proteinelor membranare

Topografia proteinelor și a glicoproteinelor din ansamblul membranei, mai ales a proteinelor transmembranare, este în interrelație cu secvența de aminoacizi din lanțurile polipeptidice.

Secvența liniară de aminoacizi poate fi dedusă direct, prin metode chimice sau indirect, din secvența ARN-ului mesager. În general, proteinele membranare pot fi izolate doar în cantități mici, iar pentru a obține secvența completă de ARN se recurge la tehnici de clonare genică. Din datele limitate obținute se construiesc secvențe de anticorpi anti-peptid sau se sintetizează probe ADN, ambele putând fi folosite în analiza librăriilor de ADN pentru a identifica corect clona proteinei membranare. Prezența unui segment lung de aminoacizi hidrofobi în secvența liniară sugerează apartenența la regiunea transmembranară a segmentului proteic. Prin aplicații computerizate dedicate se pot crea grafice pentru a deduce hidrofobicitatea relativă a regiunilor secvenței liniare de aminoacizi, astfel că din analiza acestui tip de grafic se pot face predicții în privința poziției domeniilor transmembranare, extracelulare și citoplasmatice a proteinelor membranare.

Se utilizează sonde chimice sau anticorpi pentru a marca și identifica secvențe peptidice expuse pe partea extracelulară sau cel citoplasmatic al bistratului lipidic,

intracelular sau din membranele izolate ale veziculelor celulare. Anticorpii anti-peptid au paratopi complementari secvenţei specifice de aminoacizi din structura proteică şi sunt utilizaţi pentru a localiza poziţia exactă a secvenţei în membrană (i.e. indiferent dacă se află intracelular sau extracelular).

O altă tehnică constă în clivarea prin intermediul unor proteaze specifice a secvenţelor citoplasmatice sau extracelulare, urmată de analiza secvenţele de polipeptid intramembranare.

Pentru a confirma ipoteze privind funcţionarea proteinelor sunt necesare tehnici de inginerie moleculară, de exemplu mutageneză situs-specifică în care pot fi eliminaţi sau substituiţi anumiţi aminoacizi sau segmente ale secvenţei proteice.

Următoarea etapă în studiul topografiei proteinelor membranare este analiza aranjamentului lor tridimensional.

Repertoriul de proteine şi glicoproteine conţinute într-o membrană celulară poate fi analizat prin electroforeză în gel de poliacrilamidă – dodecil-sulfat de sodiu (SDS-PAGE). SDS este un surfactant care solubilizează şi uniformizează sarcina electrică a proteinelor membranare. În metoda uni-dimensională de SDS–PAGE, proteinele membranare sunt discriminate doar pe criteriul greutăţii lor moleculare (dar glicozilarea unor proteine le poate încetini migrarea în câmpul de electroforeză). O rezoluţie mai bună în diferenţierea speciilor proteice este obţinută prin aplicarea metodei de electroforeză bidimensională în care proteinele sunt separate secvenţial prin 2 criterii, în prima dimensiune pe baza punctului lor izoelectric, iar în a 2-a dimensiune prin SDS-PAGE. Prin electroforeza bidimensională au fost caracterizate aproximativ 70 de proteine din membrana hepatocitelor recoltate de la şobolan; proteinele au profilul biologic diferenţiat în funcţie de greutatea moleculară şi punctul izoelectric.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.4. Arhitectura supramoleculară a membranelor celulare

VII.4.1. Evoluția modelelor biofizice

De-a lungul timpului, pornind de la conceptul bistratului lipidic, au fost formulate câteva modele a membranei celulare (membrana plasmatică).

Existența membranei plasmatice a fost confirmată experimental, pentru prima dată, la plante: ***Pfeffer*** (1877), inventatorul *osmometrului* ***Pfeffer***, prin câteva experimente cu celule din plante, în care le-a testat în medii cu diferite presiuni osmotice, a ajuns la concluzia că doar prin existența unei membrane osmotic permeabile ar putea fi explicate modificările de volum celular observate. Ulterior, observațiile din experimente pe eritrocite au susținut pe deplin postulatul lui ***Pfeffer***.

Tabel VII.4.1.1. Evoluția experimentală a modelului bistratului lipidic

An	*Cercetator/i*	*Rezultate experimentale*
1665	**R. Hooke**	Examinarea microscopică a coajei arborelui de plută, Hooke inventând termenul de „celulă"
1672	**R. Hooke**	"Gauri negre" în bule de săpun
1704	**I. Newton**	Grosimea filmului de detergent: 9.5 nm
1877	**W. Pheffer**	Osmometrul artificial si membrana plasmatică
1890	**E. Overton**	Coeficientul de partiție ulei de măsline / apă și natura lipoidă a membranei celulare
1917	**I. Langmuir**	Tehnica monostratului; orientarea la interfața dintre medii a moleculelor „spumoase" (amfipate)
1920	**H. Fricke**	Măsuratori electrice a eritrocitelor: grosimea membranei plasmatice este mai mică de 10 nm
1925	**E.Gorter and F. Grendel**	Eritrocitele acoperite de 2 monostraturi de lipide; s- a propus modelul bistratului fluid
1940	**Davson /Danielli**	Modelul sandwich-ului proteină-bistrat lipidic- proteină
1950	**Robertson**	Microscopia electronică – conceptul de membrană- unitate
1961	**Rudin et al.**	Tehnica experimentală pentru reconstituirea bistratului lipidic
1965	**Bangham et al.**	Vezicule cu structuri de bistrat lipidic: lipozomii

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Compoziția membranei plasmatice a fost investigată pentru prima dată de ***Overton***, un cercetător care a derulat aproape 10 000 de experimente cu mai mult de 500 de compuși chimici, în care a măsurat cinetica de influx intracelular și a comparat-o cu coeficienții de partiție a compușilor. Din analiza rezultatelor a concluzionat că membrana celulară trebuie să fie alcătuită din lipide.

Grosimea membranei a fost măsurată experimental în 1923-1925, de către ***Fricke***, prin determinarea capacitanței unei soluții de eritrocite. Din formula capacitanței, el a calculat grosimea ca fiind între 3,3 și 11 nm, valori ce corespund măsurătorilor moderne ale biomembranelor și membranelor artificiale.

Organizarea moleculară a lipidelor membranare a fost descoperită după cum este ilustrat, în ordine cronologică, în tabelul anterior, prin diverse tehnici experimentale și modele teoretice.

În evoluția modelelor de structură a biomembranelor au existat trei perioade, reprezentate de:

1) Perioada clasică, a modelului ***Gorter-Grendel-Davson-Danielli.***
2) Perioada unității de membrană, a anilor 1950.
3) Perioada modernă, a *modelului mozaicului fluid,* de la începutul anilor 1960 și în prezent.

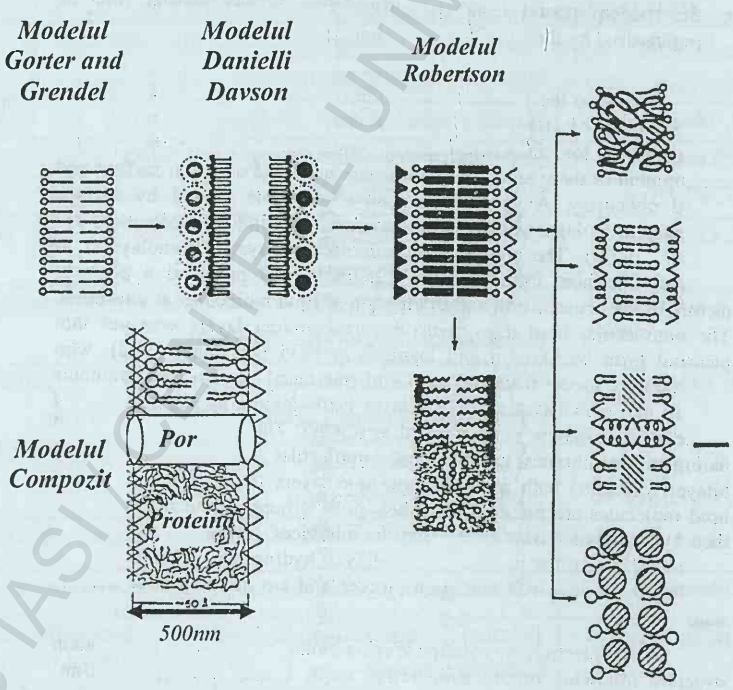


Figura VII.4.1.1. Evoluția modelelor de biomembrană (explicații în text) *(106)*

Prototipul în dezvoltarea a numeroase modele de biomembrane în anii 1960 a fost modelul lui ***Gorter*** și ***Grendel***: prin măsurarea suprafeței ocupate de lipide izolate din eritrocite, cei doi cercetători au estimat că lipidele din membrană sunt suficiente pentru a

BCU IASI - UNIVERSITY LIBRARY

forma un înveliș cu grosime corespondentă la 2 olecule, pentru întreaga suprafață celulară:

$$\frac{Suprafața\ ocupată\ în\ monostratul\ experimental}{Suprafața\ eritrocitului} \approx 2$$

Un alt model, din 1935, ***Davson - Danielli***, a introdus conceptul stratului dublu de lipide, în care sunt ancorate straturi de proteine, corespunzând modelului trilaminar tip sandwich proteină-bistrat lipidic-proteină, dedus din rezultate experimentale pe celule și sisteme model.

Cele 2 modele menționate mai sus au condus la ipoteza bistratului fluid care poate fi descris ca: *structura fundamentală a tuturor biomembranelor constă dintr-un bistrat lipidic cu straturi non-lipidice adsorbite (majoritatea fiind proteine).* Moleculele lipidice sunt orientate cu regiunile polare, hidrofile, spre exteriorul membranei și lanțurile hidrocarbonate, hidrofobe, departe de interfața dintre membrană și mediile extracelular și intracelular, în interiorul membranei, fiind menținute împreună prin forțe ***van der Waals***.

În anii 1950, modelul bistratului fluid a fost generalizat de către ***Robertson,*** care, pe baza observațiilor din microscopie electronică, a concluzionat că toate membranele biologice sunt formate din bistraturi lipidice sau variante modificate ale acestora. Au mai existat și alte modele, dar, cu excepția modelului sferic al lui ***Sjostrand*** și ***Lucy***, celelalte modele propuse de ***Benson***, ***Singer*** și ***Nicholson*** și ***Green*** sunt derivate din ipoteza "membranei-unitate" a lui ***Robertson***.

VII.4.2. Modelul „mozaicului fluid"

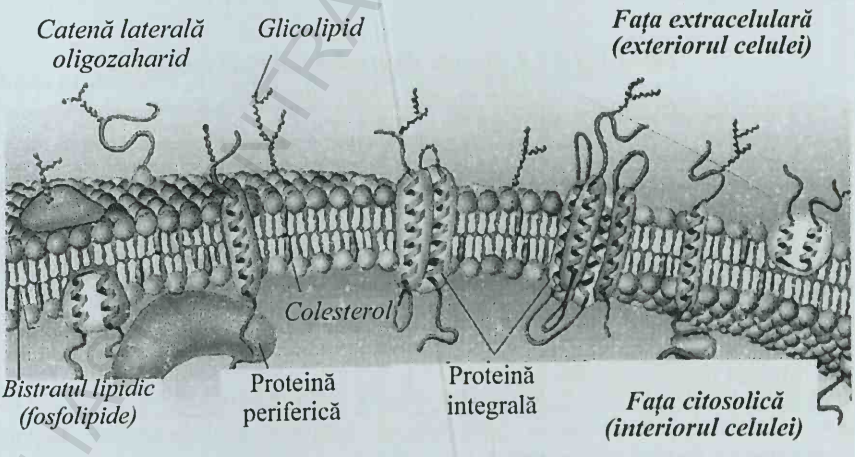


Figura VII.4.2.1. Modelul mozaicului fluid *(Tobin, Morell, 107)*

Actualul model, cel al *"mozaicului fluid în echilibru dinamic"* al lui ***Singer*** și ***Nicholson***, dezvoltat pe dovezi experimentale și argumente teoretice, este acceptat ca fiind modelul de referință în prezent. Chiar dacă mai apar modificări în relație cu tehnicile noi de studiu care se dezvoltă, esența modelului este neschimbată: membrana este *'o soluție bidimensional orientată, care încorporează proteine integrale în solventul viscos*

bistratificat de fosfolipide' (***Singer*** şi ***Nicolson***, 1972).

Acest model are la bază afirmaţia conform căreia bistratul lipidic se comportă ca o barieră de permeabilitate în care există proteine specifice, atât integrale cât şi periferice, care au rolul de a media majoritatea funcţiilor membranare. De fapt, structura membranară ar trebui percepută ca fiind alcătuită din domenii ordonate, *cristaline,* şi domenii mai puţin ordonate, *fluide*, iar proteinele ar trebui să fie clasificate în funcţie de nivelul de entropie (ordonare) determinat.

După cum reiese şi din caracteristicile modelului, organizarea membranară nu este deloc simetrică. Asimetria este dependentă de:

- distribuţia inegală a proteinelor intramembranare
- localizarea externă a carbohidraţilor
- enzime specifice localizate exclusiv pe partea externă sau internă a membranei
- unele tipuri de membrană au asimetrie regională (i.e. bordura viloasă a celulelor secretoare de mucus, sinapsele, joncţiunile gap etc.)
- asimetria intrinsecă a distribuţiei fosfolipidelor între cele două straturi (care, însă, poate varia chiar şi la aceeaşi membrană, în diferite stări, din cauza mobilităţii de tip *flip-flop* a fosfolipidelor).

Componentele individuale ale membranei nu au un comportament static, ci pot avea diferite tipuri de mişcări, cu intervale de timp corespondente diferite, de la *vibraţii moleculare (femtosecunde)* până la translaţii de pe un strat lipidic pe altul prin mişcări de tip *flip-flop*, doar pentru lipide *(câteva ore)*, după cum este prezentat în tabelul de mai jos. În cadrul acestui model, lipidele au posibilitatea de a difuza lateral şi a se roti (în jurul unui ax imaginar) în fiecare strat al bistratului şi doar rareori se deplasează de pe un strat pe altul prin transfer *flip-flop*.

Tabel VII.4.2.1. Durata diverselor tipuri de mişcări la nivelul membranelor biologice

Tip de mişcare	*Durată (sec)*
Vibraţii atomice	$10^{-14} - 10^{-13}$
Izomerizări trans	$10^{-10} - 10^{-8}$
Rotaţia lipidelor în jurul axei longitudinale	10^{-9}
'Salturi' laterale atât ale lipidelor cât şi proteinelor (difuzie laterală)	$10^{-8} - 10^{-6}$
Rotaţii ale proteinelor	$10^{-4} - 10^{-2}$
Mişcări *flip-flop* ale lipidelor	$10^{1} - 10^{6}$

Motilitatea lipidelor şi proteinelor

Majoritatea lanţurilor de carbohidraţi din constituţia lipidelor sunt într-o formă *fluidă (echilibru dinamic)* ca urmare legăturilor C-C, deoarece acest tip de legătură chimică permite mişcări de flexie şi de rotaţie.

Deşi lipidele se pot deplasa liber prin mişcări de lateralitate în planul membranei plasmatice, rareori ele vor trece de pe un strat pe celălalt (*flip-flop*). O moleculă de fosfolipid se poate deplasa pe o distanţă de cca 2 μm într-o secundă, în timp ce intervalul

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de timp corespondent unei mişcări *flip-flop* variază de la 8 ore la 1-2 zile. Deoarece distribuţia fosfolipidelor este asimetrică de-o parte şi de alta a bistratului lipidic membranar, se consideră că nu există mişcări de *flip-flop* aleatorii, pentru întreaga membrană. Probabilitatea ca un lipid membranar să se deplaseze de pe un strat pe altul al membranei celulare este invers proporţional cu gradul caracterului amfipatic al moleculei. Energia necesară ar fi prea mare pentru a permite capetelor hidrofile ale fosfolipidelor să traverseze interiorul hidrofob al membranei, de pe un versant al membranei pe altul, în absenţa unui catalizator, a unui proces care să faciliteze aceasta.

Proteinele se pot deplasa prin difuzie laterală şi rotaţie, dar rareori îşi inversează orientarea. Motilitatea proteinelor este influenţată de distribuţia asimetrică a fosfolipidelor, şi implicit a capetelor polare, dar şi de diferenţele în fluiditate a stratului intern versus cel extern membranar.

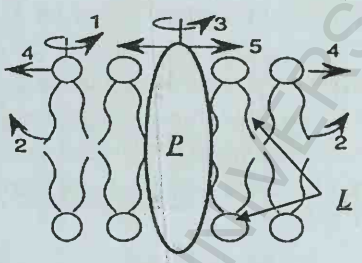


Figura VII.4.2.2. Mişcări ale proteinelor şi lipidelor în membrană
Lipide (L): 1 -rotaţie, 2-flexie, 4-difuzie laterală; Proteine (P): 3 - rotaţie, 5 - difuzie laterală (106)

Mobilitatea proteinelor şi organizarea în domenii membranare

Proteinele au posibilitatea de a se deplasa prin difuzie laterală, dar cu viteze de 100-100000 ori mai mici decât lipidele. Unele proteine, cum este *bacteriorodopsina*, formează agregate mari şi sunt efectiv imobile în membrana plasmatică. În ţesuturile în care suprafeţele celulare sunt polarizate funcţional, există un grad de restricţie a mobilităţii laterale a proteinelor, în caz contrar funcţionarea celulară eficientă ar fi compromisă. În majoritatea membranelor specializate, de exemplu *marginea în perie a celulelor epiteliului tubular renal sau a epiteliului intestinal*, membrana plasmatică este ancorată pe o reţea extinsă de citoschelet. Acest tip de membrane au densităţi mari de 5'-nucleotidază, fosfataza alcalină şi aminopeptidaze. Pe de altă parte, ATP-aza Na^+/K^+ funcţionează în principal la nivelul domeniului bazo-lateral al membranei plasmatice. Aceste domenii membranare sunt separate de joncţiuni strânse. Structura rigidă a acestor joncţiuni limitează mişcările proteinelor între domenii funcţionale dar permite mişcările de lateralitate a fosfolipidelor în stratul intern al membranei.

Alţi factori care impun restricţii ale mobilităţii proteinelor membranare sunt interacţiunile acestora cu citoscheletul şi glicocalixul.

Ca urmare a deplasării prin bistratul lipidic, proteinele se pot aduna în agregate mari, care vor reflecta indirect gradul de activitate metabolică membranară.

VII.5. Biofizica transportului transmembranar

VII.5.1. Clasificarea biomembranelor în funcție de permeabilitate

Schimburile de materie şi energie prin membranele periferice sunt esențiale pentru biosisteme, acestea fiind sisteme deschise. Toate membranele biologice au, în grade diferite, o permeabilitate *selectivă* şi *nu pot fi considerate niciodată doar bariere poroase (cum sunt membranele artificiale).*

Într-o clasificare generală, se poate spune că, în legatură cu permeabilitatea lor, membranele pot fi:

- membrane *permeabile*, prin care trec atât solventul cât şi solviții, depinzând doar de mărimea lor;
- membrane *semipermeabile*, când trece doar solventul, nu şi solviții;
- membrane *selectiv permeabile*: este cazul membranelor biologice, unde permeabilitatea depinde de tipul substanței dizolvate. De fapt, în cazul biomembranelor, permeabilitatea selectivă este realizată prin diferite tipuri de sisteme de transport (pasiv sau activ).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Legenda figurii VII.5.1.1.

(1) ***Dublu strat lipidic:*** *element universal al tuturor membranelor celulare.*

(2) ***Proteine membranare:*** *integrale şi periferice*

(3) ***Permeabilitate şi transport:*** *transport pasiv, fără consum de energie, prin difuzie simplă sau difuzie facilitată. Transport activ, cu consum de energie.*

(4) ***Potențial electrochimic:*** *forța motrice pentru transportul membranar, oxidativ şi foto-fosforilare.*

(5) ***Pompă de*** Na^+***-***K^+

(6) ***Canale ionice****, voltaj dependente şi dependente de ligand*

(7) ***Nucleu (Membrana nucleară)***

(8) ***Membrane ale organitelor celulare:*** *mitocondria – transformă hrana în energie utilizabilă (ATP); cloroplastele (în plante) transformă energia solară în alte forme de energie.*

(9) ***Membrane lipidice artificiale bistratificate (BLM):*** *BLM plane şi lipozomi.*

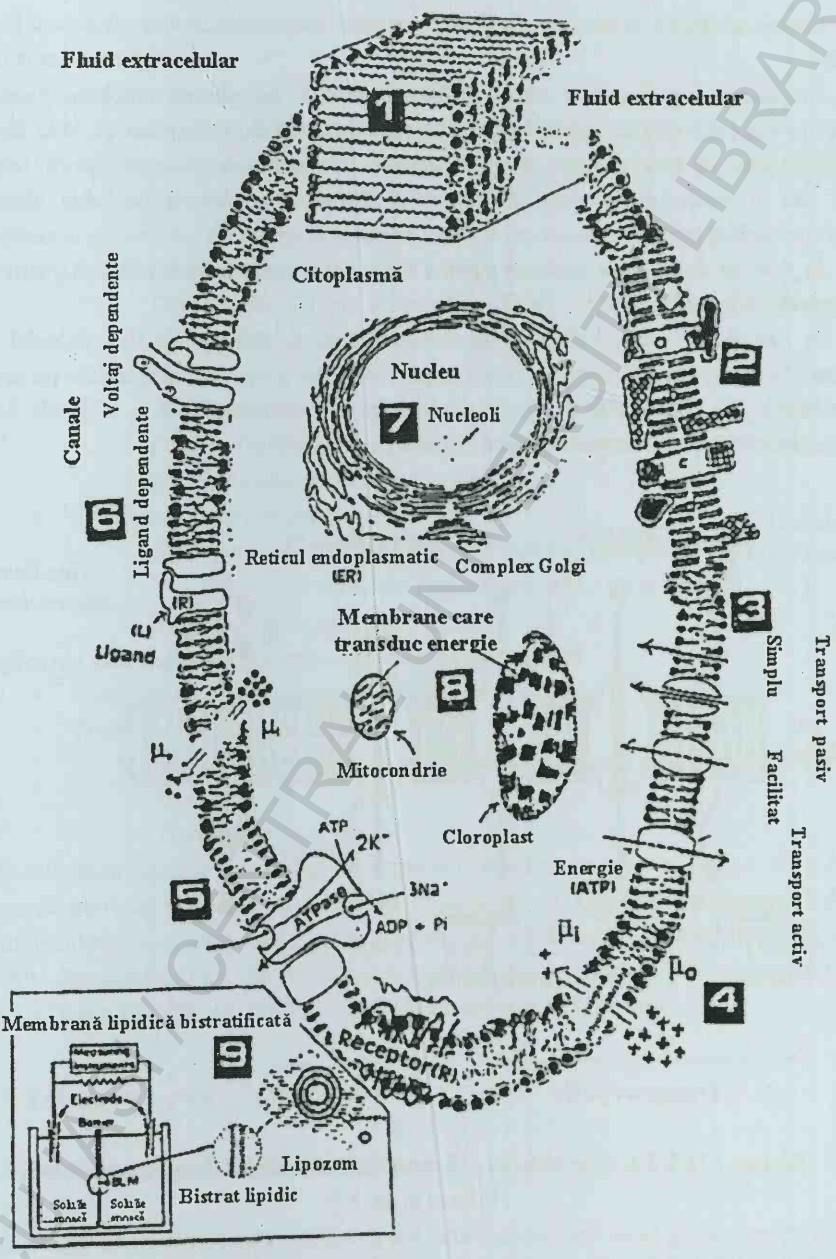


Figura VII.5.1.1. Celula - complexitatea structurii şi transportului membranar – (Ti Tien H, 2000, 106)

BCU "I. C. BRĂTIANU" UNIVERSITY LIBRARY

VII.5.2. Clasificarea şi diagrama proceselor de transport transmembranar

Pentru a studia procesele de transport prin biomembrane pot fi folosite diferite abordări:

- ***În funcţie de mărimea substratului molecular transportat***, molecule cu mărimi diferite vor trece diferit prin membranele celulare cu permeabilitate selectivă. Aceste procese de transport sunt, în mod normal, studiate separat, ca *sisteme de microtransport* (transportul ionilor sau a moleculelor mici nelegate) şi *sisteme de macrotransport* (transportul macromoleculelor).
- ***În funcţie de energia utilizată pentru transport,*** procesul poate fi fără (*pasiv*) sau cu (*activ*) consum de energie.
- ***În funcţie de natura forţelor de conducere şi de ecuaţia de flux folosită***, teoriile referitoare la transportul membranar pot fi împărţite în trei grupe: (a) cele bazate pe ecuaţia lui *Nernst-Plank*, (2) cele bazate pe conceptul vitezei de reacţie absolută şi (3) cele bazate pe principiul ireversibilităţii termodinamice.

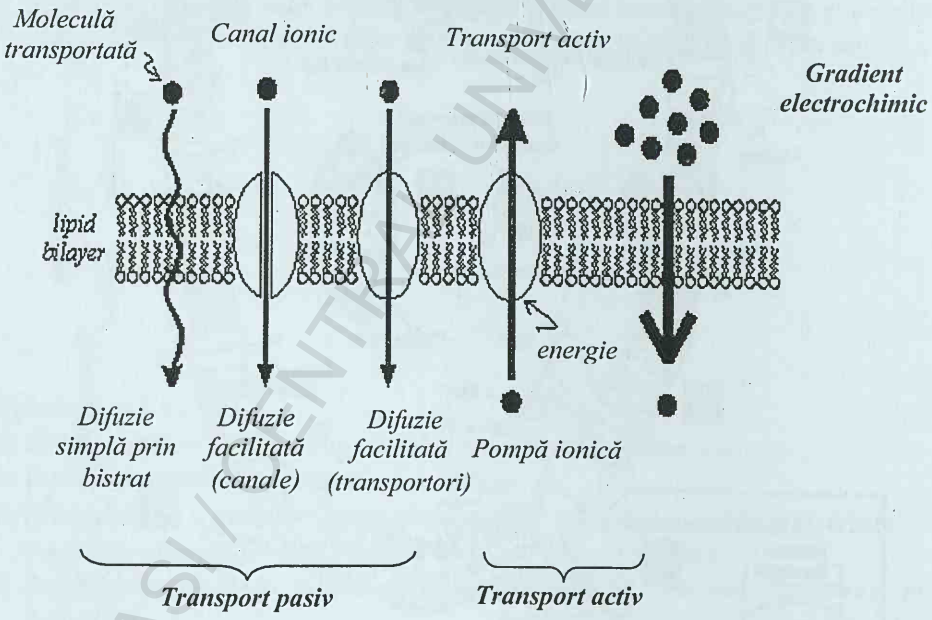


Figura VII.5.2.1. Prezentarea schematică a sistemelor de microtransport *(V.Rusu et al, 87)*

Figura VII.5.2.1. este o reprezentare schematică a sistemelor de microtransport membranar. Transportul independent energetic (prin difuzie) şi cel dependent energetic sunt prezentate prin câteva exemple. Substanţele hidrofobe mici difuzează pur şi simplu prin bistratul lipidic, însă compuşii hidrofili nu pot difuza, astfel încât vor traversa membrana prin intermediul unor proteine membranare integrale (difuzie facilitată): transportatori,

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

canale (ambele modalitaţi fiind fără consum energetic) sau prin 'pompe'. Difuzia simplă şi cea facilitată se realizează doar în sensul gradienţilor electrochimici, fără consum energetic. Toate celelalte tipuri de transport reprezentate în figură, necesită consum energetic:

- *transportul activ primar* (prin 'pompe' ATP-dependente), foloseşte energia fără a-şi modifica substratul;
- *transportul activ secundar* utilizează energia de la un tip de transport pasiv pentru transportul altui tip de substrat, în sens opus gradienţilor electrochimici;
- un alt caz de transport dependent energetic este *translocarea de grup*, când un substrat este întotdeauna modificat covalent.

Clasificarea sistemelor de microtransfer în funcţie de consumul energetic

- ***Transport pasiv (entropic)***
  - Difuzia simplă (prin bistratul lipidic al membranei, pentru substanţe liposolubile cu coeficient ridicat de partiţie);
  - Osmoza
  - Echilibrul Donnan
  - Difuzia facilitată: prin proteine transportatoare (transportori) sau prin proteine canal (canale ionice)
- ***Transport activ (antientropic)***
  - Transport activ primar (prin ATP-aze sau pompe ionice)
  - Transport activ secundar (legat frecvent de un gradient de Na^+)
  - Translocaţie de grup

Clasificarea sistemelor de macrotransfer (macrotransport)

- *Transportul direct al macromoleculelor*
- *Transportul prin vezicule:*
  - Endocitoza: pinocitoza (dependentă sau nu de receptor) sau fagocitoza.
  - Exocitoza
  - Transcitoza.

O altă clasificare a sistemelor de transport membranar este în funcţie de *numărul speciilor transportate* şi de *sensul de transport al acestora*. Când este transportată doar o specie moleculară, sistemul este numit *uniport*, iar dacă sunt transportate două specii moleculare denumirea este de *cotransport*, fiind *simport* când ambele specii sunt transportate în acelaşi sens sau *antiport* dacă sunt transportate în sensuri opuse.

VII.5.3. Transportul pasiv

VII.5.3.1. Difuzia simplă. Legile lui Fick

Acest tip de transport prin biomembrane este realizat fără consum de energie şi fără a fi intermediat de o anumită proteină membranară, în sensul gradienţilor electrochimici, de la un cvasi-echilibru la altul. Se pare că (***Tien H.T.***), la celulele vii, difuzia este un proces foarte rapid, timpul necesar difuziei pentru o celulă fiind estimat la aproximativ la 10^{-3} sec. Difuzia este un proces pasiv, spontan, care conduce la un echilibru termodinamic, cu creşterea entropiei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

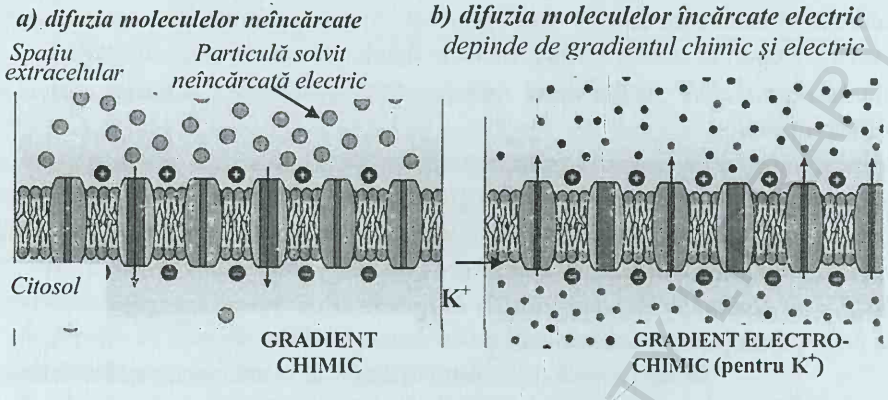


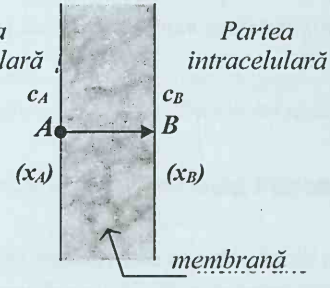
Figura VII.5.3.1.1. Transportul pasiv pentru molecule neîncărcate (a) și pentru molecule încărcate electric (b) – (107)

Difuzia pasivă este ușor de înțeles dacă ne gândim că atunci când un obiect este în mișcare, acesta trebuie condus de o forță, frecvent legată, în acest caz, de un gradient electric și/sau chimic, precum și de presiune sau temperatură. Acest gradient poate fi considerat echivalentul unei forțe motrice împotriva rezistenței membranare (legate de fluiditatea membranei și de coeficientul de partiție).

Difuzia pasivă este guvernată de legile lui Fick și depinde de o serie de factori, în relație cu această lege.

Legile lui Fick

Pentru a înțelege relațiile matematice care guvernează difuzia simplă, să considerăm o membrană (figura de mai jos), care va fi traversată într-un singur sens (orizontal, din punctul *A* în punctul *B*), de o substanță (masa transportată *m*), de la concentrația c_A în punctul *A* la concentrația c_B în punctul *B*, $c_A > c_B$, pe distanța $x_B - x_A$, și prin suprafața membranară *S*, în timpul Δt.



FiguraVII.5.3.1.2. Reprezentarea schematică a parametrilor membranari pentru legea lui Fick

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Din ecuaţia Nernst-Plank, fluxul de transport (pe unitatea de suprafaţă) depinde de mobilitatea substanţei, concentraţia sa şi de forţa de conducere:

$$flux = mobilitate\ x\ concentraţie\ x\ forţă$$

Următoarele relaţii pot fi scrise (semnul minus denotă că transportul are loc în sensul de scădere a concentraţiei):

$$F = \frac{\Delta m}{S} = D \cdot C \cdot \left(-\frac{\Delta c}{\Delta x}\right)$$

unde:

- Fluxul, F, reprezintă traficul de particule transportate prin membrană, pe unitatea de suprafaţă şi de timp; se poate scrie că:

$$F = \frac{\Delta m}{S \cdot \Delta t}$$

- Mobilitatea, D, este un coeficient de difuzie care depinde de diametrul speciei transportate, temperatura şi fluiditatea membranară.
- Forţa este reprezentată, cum am precizat anterior, prin gradientul de concentraţie, $\Delta c/\Delta x$, în cazul transportului unei specii fără sarcină electrică; la speciile cu sarcină electrică, se ţine cont şi de gradientul electric.

- S este suprafaţa de schimb (presupunem a fi o unitate)
- c_A, c_B sunt concentraţiile moleculei transportate ($c_A > c_B$)
- $x_A - x_B$, defineşte distanţa dintre punctele A şi B, între care molecula este transportată
- Δt este timpul în care este transportată molecula (presupunem a fi o unitate).

Se poate scrie:

$$\Delta m = -D \cdot \frac{C_B - C_A}{x_B - x_A} \Delta t \cdot S$$

unde:

$$\frac{C_B - C_A}{x_B - x_A} = \frac{\Delta c}{\Delta x}$$

$$\Downarrow$$

$$\frac{\Delta m}{\Delta t \cdot S} = -D \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x}$$

Această ultimă ecuaţie reprezintă *prima lege a lui Fick*: *masa de substanţă care difuzează în unitatea de timp printr-o unitate de suprafaţă a membranei este direct proporţională cu gradientul de concentraţie, printr-un coeficient de proporţionalitate (difuzie)*.

Din aceste relaţii se poate observa că difuzia depinde de mai mulţi factori:

1. mărimea particulei
2. gradientul electric
3. gradientul chimic
4. coeficientul de solubilitate a particulei transportate (coeficientul de partiţie sau de difuzie).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Anumite ipoteze necesită a fi făcute:

- gradientul de concentraţie de-a lungul membranei este omogen;
- calea de difuzie este dreaptă şi perpendiculară pe planul membranar.

A doua lege a lui Fick: variaţia în timp a concentraţiei în orice punct al soluţiei este proporţională cu variaţia spaţială a gradientului de concentraţie, printr-un coeficient de proporţionalitate (difuzie).

VII.5.3.2. Difuzia facilitată: canalele ionice

Dacă particulele mici hidrofobe pot traversa membrana prin difuzie simplă, toate celelalte substanţe mici, dar nehidrofobe, au nevoie de 'ajutor' să o strabată. Acest ajutor este mediat, de obicei, de o proteină membranară integrală (un canal sau un transportor), care functionează fără consum energetic (în cazul unor tipuri de transport pasiv facilitat), sau o 'pompă' care are nevoie de energie (în cazul unui transport activ).

Difuzia facilitată este un tip de transport pasiv în care o particulă hidrofilă (ion, moleculă) este transportată prin membrană, fără consum energetic, în sensul gradientului său electrochimic, ajutată de o proteină membranară integrală (*canal ionic* sau *transportator*, ultimul numit şi *cărăuş*). Altfel, membrana respectivă este impermeabilă pentru particula hidrofilă.

VII.5.3.2.1. Ionoforii

Ionoforii sunt molecule liposolubile capabile să medieze transportul ionic prin bistratul lipidic membranar şi în consecinţă, să crească selectiv permeabilitatea membranară pentru unii ioni. Ionoforii sunt fie sintetici, fie naturali, sintetizaţi de unele microorganisme. *Ei au fost o dovadă experimentală pentru existenţa canalelor ionice.*

Mulţi ionofori aparuţi natural sunt antibiotice cu origine microbiană. Primul ionofor a fost *gramicidina*, un polipeptid produs de *Bacillus brevis*, cu 15 aminoacizi în structura primară şi lanţuri laterale hidrofobe; aceasta, introdusă în peretele microorganismelor, formează un canal pentru cationi şi, ca urmare a transportului cationic, ucide bacteria gram pozitivă. Se poate realiza o conductanţă de 6,28 x 10^6 cationi/sec.

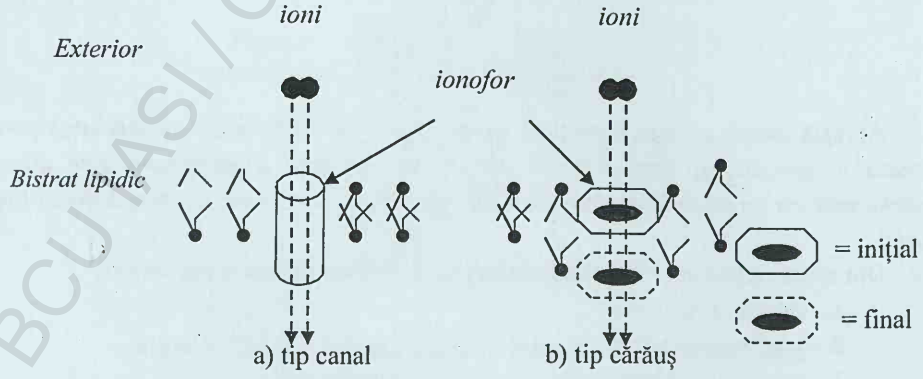
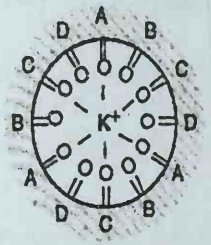


Figura VII.5.3.2.1. Reprezentare schematică a ionoforilor: a) tip canal; b) tip cărăuş

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sunt cunoscute două tipuri de ionofori: de tip canal (de exemplu *gramicidina*) şi de tip cărăuş (de exemplu *valinomicina*). Masa lor moleculară este de aproximativ 200 – 2000 Da şi sunt compuşi din câteva subunităţi similare, adică sunt oligomerici, în comparaţie cu canalele membranare polimerice, reprezentate de proteine integrale.

Unii ionofori, cum sunt *nistatinul* şi *amfotericina B*, au utilizare terapeutică, fiind utilizaţi ca *antimicotice*, deoarece formează, selectiv, pori doar în membranele care conţin steroli, cum sunt membranele fungice. Nu există date de certitudine în privinţa existenţei ionoforilor endogeni, care ar putea explica difuzia simplă a ionilor prin bistratul lipidic.



A = L-lactat
B = L-valina
C = D-hidroxiizovalerat
D = D-valina

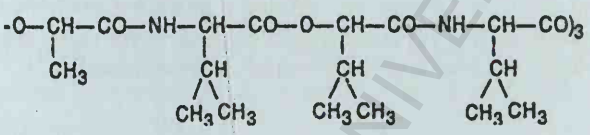


Figura VII.5.3.2.2. Reprezentare schematică a valinomicinei, care creşte permeabilitatea pentru K^+ (106)

VII.5.3.2.2. Metoda „patch – clamp" pentru studiul canalelor ionice

Aceasta este o tehnică experimentală care face posibilă măsurarea conductanţei prin canalele ionice. Este importantă pentru studiul funcţionalităţii canalelor ionice.

Pentru această tehnică, *Neher* şi ***Sakmann*** au luat *Premiul Nobel pentru Fiziologie sau Medicină.*

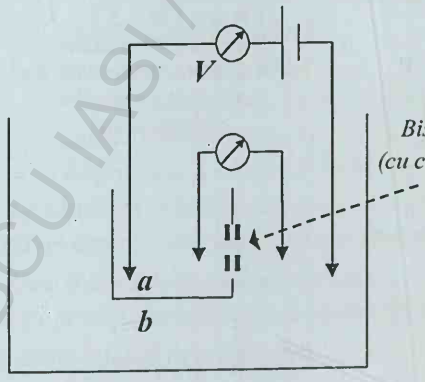


Figura VII.5.3.2.2.1. Principiul metodei patch-clamp
A = microampermetru;
V = voltmetru;
a, b = compartimentele cu soluţie (a se vedea textul)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

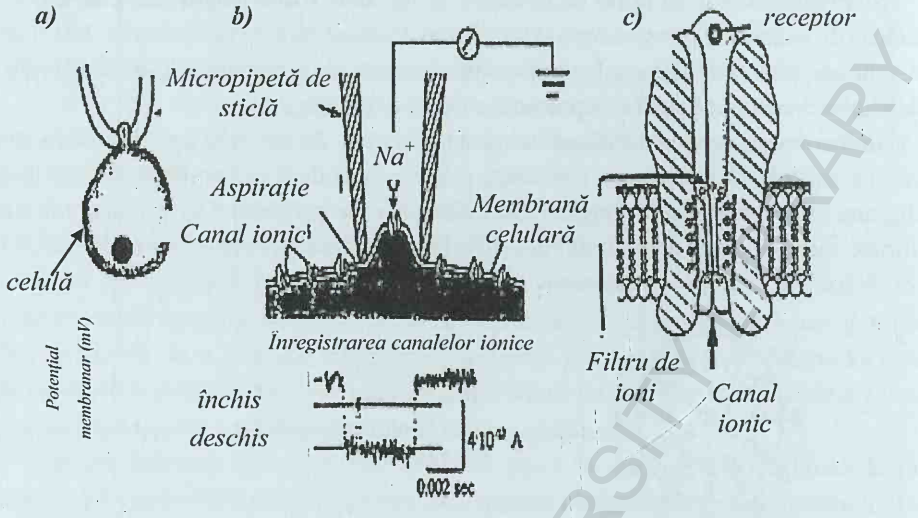


Figura VII.5.3.2.2.2. *a) Tehnica de realizare a 'petecelor' membranare; b) Măsurarea fluxului de Na^+ printr-un singur canal de sodiu voltaj dependent; c) Exemplu de canal ionic (aici cuplat cu un receptor) (57)*

a) Realizarea fragmentelor de membrană

b) Depolarizarea stimulează fluxul de Na^+ prin canalul ionic

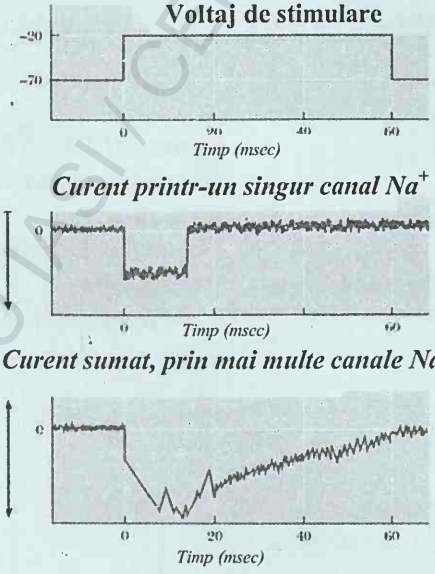


Figura VII.5.3.2.2.3. Tehnica patch-clamp: reprezentare schematică și exemple de grafice înregistrate

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În principiu, această metodă constă în plasarea unei micropipete din sticlă cu diametrul mai mic de 0,5 μm în contact cu o regiune delimitată (un 'petic') de membrană celulară, care cuprinde câteva canale ionice de același tip. Doi microelectrozi se plasează pe ambele fețe ale membranei, unul dintre ei prin intermediul micropipetei, aplicându-se astfel o diferență de tensiune la nivel membranar. Cu un microampermetru poate fi citită intensitatea curentului, notată cu *A*.

Raportul *A/V* se numește *conductanță* și are ca unitate de masură ***Siemens (S),*** cu ecuația de conversie:

$$1pS = 6{,}28 \times 10^6 \text{ ioni/sec}$$

Există două tipuri de metode patch-clamp:
- pe celula în întregime
- pe membrana celulară izolată.

VII.5.3.2.3. Proprietățile canalelor ionice

Canalele ionice sunt proteine membranare integrale care, datorită structurii, pot forma 'pori', pentru o anumită specie ionică, în bistratul membranei celulare; pot exista 2 conformații : deschis sau închis. Când sunt deschise, ionii pot trece prin canal, producând un curent electric și modificând potențialul membranar. De exemplu, canalele de sodiu care controlează trecerea ionilor de sodiu în timpul unui potențial de acțiune, sunt caracteristice majorității membranelor celulelor nervoase și musculare. Multe medicamente, cum sunt anestezicele locale și antiaritmicele, blochează aceste canale și, astfel, întrerup tranzitoriu fluxul de ioni prin ele.

Unele canale ionice sunt activate (deschise) printr-un semnal electric *(voltaj-dependente),* altele prin semnale chimice *(ligand-dependente)*, altele mecanic. Deschiderea canalelor voltaj-dependente apare ca rezultat al modificării gradientului de potențial între cele două fețe ale membranei. Canalele *dependente de receptor* sunt deschise în urma legării moleculelor ligand (de exemplu a neurotransmițătorilor) de situsurile receptorului *(a se vedea și capitolul VII.6.4.7.)*.

O posibilă *clasificare* este următoarea:
- canale voltaj-dependente
- canale deschise mecanic
- canale deschise prin liganzi extracelulari (liganzi, mediatori, neuromediatori ...)
- canale deschise prin liganzi intracelulari (fosforilare/defosforilare, dependente de proteina G, mesageri intracelulari secundari ...).

Deschiderea și închiderea canalelor ionice sunt realizate printr-o schimbare rapidă a conformației complexului proteic (***Tien, H.T.***, 2000).

Cele mai studiate canale sunt cele care permit trecerea ionilor de Na^+, K^+ sau Ca^{2+}. În ceea ce privește conformația și modalitatea de deschidere, în raport cu țesutul unde se găsesc, există diferite tipuri de canale de Na^+, K^+ si Ca^{2+} sau anioni.

BCU MEDICINA CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Canalul de Na^+

a) Canalul de Na^+ voltaj dependent:

La mamifere, este reprezentat de o proteină membranară formată din circa 2000 aminoacizi cu 2 subunităţi, fiecare cu domenii transmembranare; fiecare subunitate transmembranară conţine şase reziduuri de arginină, încarcate pozitiv, cu rol în deschiderea canalului.

În cazul depolarizării membranei reziduurile încărcate electric trec înspre exteriorul structurii canalului, deschizându-l astfel.

Ca urmare, ionii de Na^+ trec intracelular, modificând diferenţa de potenţial dintre cele două feţe ale membranei.

b) Alte tipuri de canale de Na^+ pot fi ligand dependente, prin asociere cu un receptor acetilcolinic.

Studii pe creierul de şobolan au adus argumente privind structura acestor canale de sodiu: sunt compuse dintr-o subunitate α de 260-kd şi două subunităţi β, de 36 kd şi 33 kd. Toate subunităţile sunt glicozilate şi există o uşoară variaţie a dimensiunilor subunităţilor β în diferite ţesuturi.

Neurotoxinele cu efecte fiziologice bine stabilite se leagă la canalele de sodiu cu afinitate şi specificitate crescută şi le modifică proprietăţile. Acestea includ tetrodoxina (TTX) precum şi toxine de la scorpion, anemona de mare, anumite bacterii.

Canalul de K^+

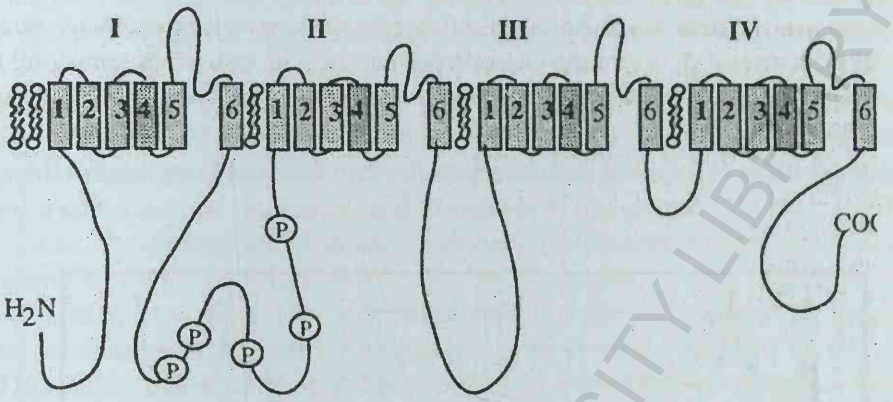
Este o proteină transmembranară cu 6 domenii, doar o subunitate şi care conţine 620 aminoacizi. A fost găsit în muşchi, nervi, în eritrocite, dar cea mai mare conductanţă pentru canalul de K^+ (între 180 şi 240 pS) a fost descoperită la nivelul reticulului sarcoplasmatic.

Alte canale ionice

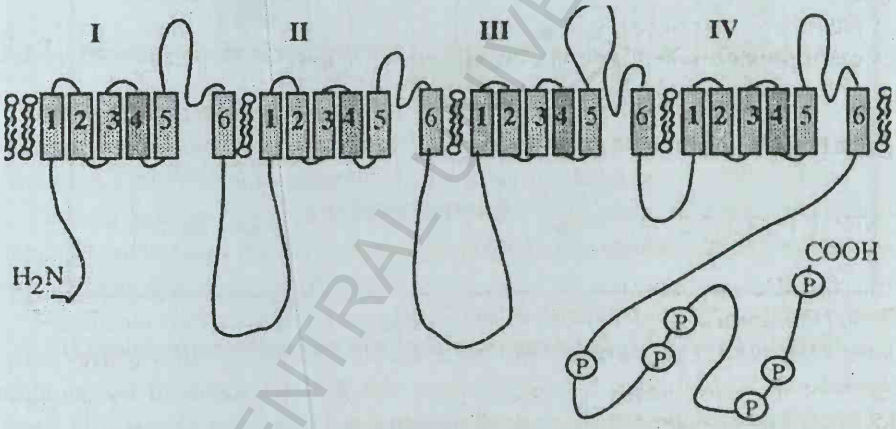
Canalele de Ca^{++} sunt prezente, de asemenea, în membranele plasmatice, fiind studiate în celulele musculare şi neuronale unde au fost influenţate medicamentos, de exemplu cu verapamil şi alţi antagonişti ai canalelor de Ca^{2+}. Când canalele sunt deschise, le permit ionilor de Ca^{2+} să se deplaseze prin membrana plasmatică în citoplasmă, în sensul gradientului electrochimic. Intrarea Ca^{2+}-ului în celulă determină răspunsuri specifice, de exemplu, fuzionarea veziculelor sinaptice cu membrana presinaptică în celulele nervoase, eliberarea de hormoni de către ţesutul endocrin şi activarea elementelor contractile în muşchi. Controlarea răspunsului celulelor la nivelurile de Ca^{2+} intracelular se realizează prin diferite proteine de legare a Ca^{2+} (calmodulina) care se pot lega la Ca^{2+}- ATP-ază, pompând Ca^{2+} în afara celulei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a) Canal de Na^+ voltaj dependent



b) Canal de Ca^{++} voltaj dependent



c) Canal de K^+ voltaj dependent

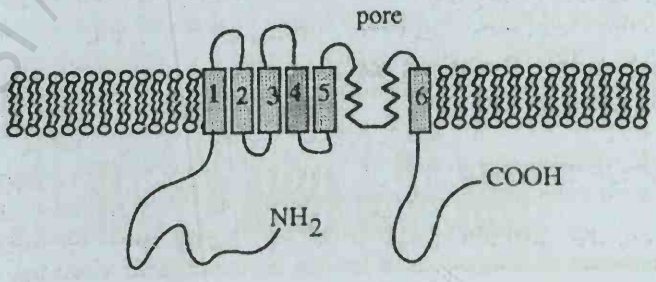


Figura VII.5.3.2.3.1. Diferite tipuri de canale ionice voltaj dependente (a, b, c) – (97)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Canale ionice asociate cu receptori

Acestea sunt proteine membranare integrale care realizează un 'canal' pentru diferite tipuri de ioni. Legarea ligandului la situsul specific de la nivelul receptorului, modifică conformația structurală a proteinei, deschizând canalul. În consecință, ionii vor trece intracelular. Înainte de legarea ligandului canalul este închis.

Unul dintre cele mai frecvente cazuri este cel al receptorilor acetilcolinici asociați cu canalele ionice de Na^+ de la nivelul sinapselor (fenomen detaliat și în capitolele **VII.6.4.7.** si **VIII**).

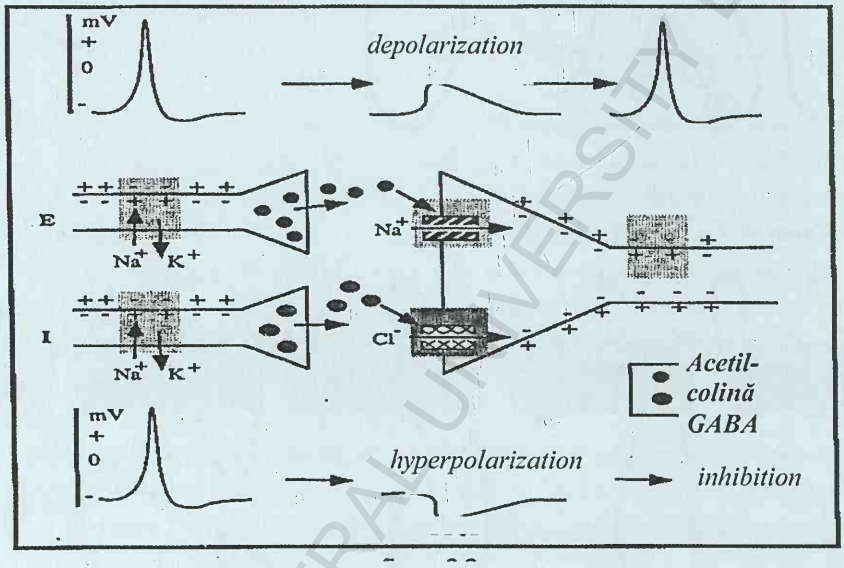


Figura VII.5.3.2.3.2. Rolul canalelor ionice în transmiterea sinaptică (1)

VII.5.3.3. Difuzia facilitată: transportorii membranari

Transportorii (numiți și cărăuși) sunt proteine integrale membranare care mediază transportul unor molecule în sensul gradientului chimic și fără consum de energie.

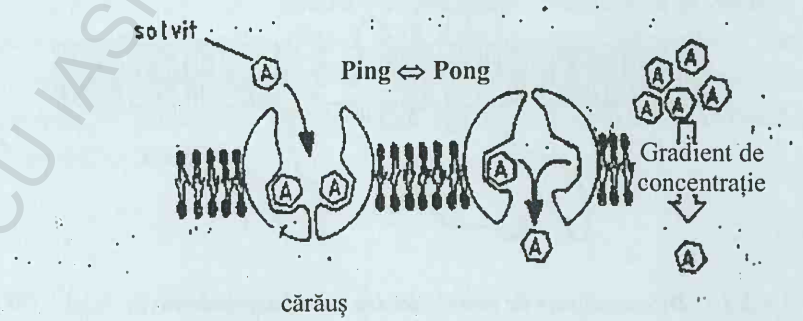


Figura VII.5.3.3.1. Difuzia facilitată prin transportori (V.Rusu et al, 87)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Întrucât numărul de transportatori membranari și numărul de situsuri per transportor este finit, acest tip de difuzie facilitată este *un proces saturabil* (opus față de difuziunea simplă și față de difuziunea facilitate prin canale ionice) și, în relație cu aceasta, prezintă o *viteză accelerată* față de difuziunea simplă dar și o *viteză maximală.* Transportatorii au afinități diferite pentru substraturile lor. Afinitățile transportatorilor membranari sunt scăzute (Kd = 10 mM) în raport cu afinitățile, de obicei ridicate, ale receptorilor membranari (82). Anumite substanțe (inhibitori) pot reduce afinitatea transportatorilor și/sau viteza de transport a subtratului prin blocarea sau chiar distrugerea de situsuri active.

Alte caracteristici ale difuziunii facilitate prin transportori sunt *specificitatea transportorilor pentru substanțele transportate* și *reversibilitatea.*

Un transportor foarte important pentru organism este transportorul de glucoză (familie de molecule transportoare, variante în funcție de țesut, GLUT1, GLUT2 ... GLUT10). Acesta este sistemul de transport implicat în mecanismul de captare celulară a radiotrasorului 18F FDG, care reprezintă cca 95% din imagistica PET, cu impact esențial, de exemplu, în evaluarea imagistică a progresiei cancerului *(a se vedea și Cursul introductiv și Lucrările practice).*

VII.5.3.4. Osmoza: bazele mecanismelor moleculare

Trecerea apei printr-o membrană artificială (membrană de separare cu pori de diferite dimensiuni) este cunoscută sub denumirea de *osmoză.* Osmoza poate fi, clasic, definită ca fiind transportul pasiv al moleculelor de solvent (dintr-o soluție) printr-o membrană.

Osmoza este un fenomen care se întâlnește și în cazul membranelor biologice; solventul este întotdeauna apa, în acest caz, iar procesul este mediat prin alte mecanisme de transport, diferite doar de un simplu pasaj.

Fenomenul clasic de osmoză este determinat de forțele osmotice, presiunea osmotică, în final de "concentrația" moleculelor de apă. Când o substanță se dizolvă în apă, numărul de molecule de apă în soluție este mai mic decât cel din apa pură, întrucât prin adăugarea substanței dizolvate în apă rezultă o soluție ce ocupă un volum mai mare decât o face apa separat. Dacă soluția este plasată pe o parte a unei membrane care este permeabilă pentru apă, nu și pentru substanța dizolvată, iar de cealaltă parte a membranei se află un volum egal de apă pură, moleculele de apă difuzează, normal, de la mai mare la mai mic, deci spre soluție, unde numărul moleculelor de apă este mai mic decât în compartimentul cu apă pură. Dacă membrana desparte două compartimente cu soluții de diferite concentrații de solvit, apa va difuza din soluția cu concentrație mai mică de solvit (soluția mai diluată, deci cu număr mai mare de molecule de apă) spre soluția cu concentrație mai mare de solvit (mai concentrată, deci cu număr mai mic de molecule de apă). Acest proces - de difuzie a moleculelor de solvent într-o zonă în care există o concentrație mai mare de solvit pentru care membrana este impermeabilă – este definit ca fenomen de *osmoză.*

Tendința de mișcare a moleculelor de solvent într-o regiune cu o concentrație mai mare de solvit poate fi prevenită prin aplicarea unei presiuni soluției mai concentrate. Presiunea care ar trebui să se aplice la nivelul membranei separatoare pentru a împiedica migrarea solventului este numită *presiune osmotică.*

Osmoza se supune mai multor **legi** care vă sunt detaliate în capitolul *Difuziunea și Osmoza* din cartea de *Lucrări practice*.

Presiunea osmotică depinde doar de numărul de particule dintr-o soluție și nu de natura lor chimică (aceasta fiind o proprietate fundamentală a soluțiilor).

Într-o soluție, presiunea osmotică ***(P)*** depinde de temperatură, volum și de presiune *(legea Van't Hoff)*:

$$P = nRT/V$$

*unde: **n** este numărul de particule (moli de substanță dizolvată), **R** constanta universală a gazelor, **T** temperatura absolută și **V** volumul soluției.*

Dacă este menținută constantă, presiunea osmotică este proporțională cu numărul de particule din soluție pe unitatea de volum de soluție. Dacă substanța dizolvată este un compus neionizat cum ar fi glucoza, presiunea osmotică este în funcție de numărul de molecule de glucoză prezente. În cazul în care substanța dizolvată ionizează și formează o soluție, fiecare ion este considerat o particulă osmotic activă.

Circulația apei prin membranele celulare. Aquaporinele

Presiunea osmotică are un rol esențial în menținerea volumului și arhitecturii celulare, precum și în asigurarea integrității morfologice și a funcțiilor celulare.

În relație cu biomembranele, se poate afirma că fluxul de apă prin acestea are loc astfel: a) prin membranele poroase cu pori suficient de mari care să permită curgerea laminară; b) prin membrane lipidice fără pori, dar care permit pătrunderea apei printr-un mecanism de dizolvare-difuzie; c) prin membrane cu pori înguști. Fluxul de apă este condus osmotic sau prin presiune: permeabilitatea osmotică, ***Pf***, și permeabilitatea de difuzie ***Pd.*** Membranele pot fi diferențiate, în principiu, prin raportul ***Pf/Pd***: valori crescute ale ***Pf/Pd*** (mai mari decât 1) indică o membrană poroasă, ***Pf/Pd = 1*** indică un mecanism de difuzie, iar valori mici ale ***Pf/Pd*** sunt caracteristice porilor înguști.

Pentru a explica fluxul de apă prin biomembrane este acceptat modelul dizolvare-difuzie. O ipoteză ar fi că apa se dizolvă în faza lipidică și traversează membrana prin difuzie simplă. De la acest model (pe planul bistratului sau pe lipozomi) poate fi calculat fluxul osmotic, determinat de presiune (***Pf***), precum și permeabilitatea de difuzie a apei prin membrana lipidică (***Pd***). Valorile ***Pf*** și ***Pd*** variază în funcție de compoziția lipidică a membranei, de la $1x10^{-5}$ până la $5x10^{-3}$ cm/sec. S-a calculat că fluxul de apă prin membrană este de aproximativ 60 000 de ori mai lent decât cel prin apă, corespunzând la aproximativ $2,2x10^{5}$ molecule de apă per moleculă fosfolipidică per secundă.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

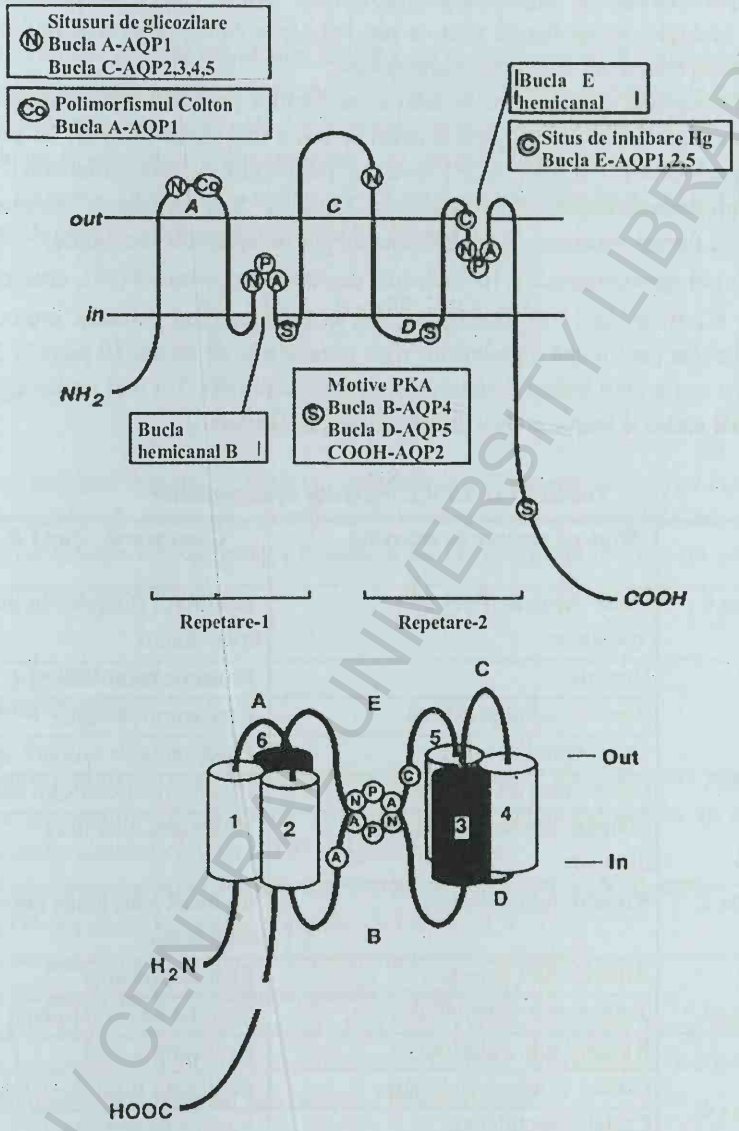


Figura VII.5.3.4.1. Exemple de aquaporine şi structura lor (97)

Raportul *Pf/Pd* pentru cel mai utilizat model membranar natural, membrana eritrocitară, este de aproximativ 5, fiind în mod clar mai mare decât 1, valoarea considerată pentru mecanismul de difuzie. Aceasta sugerează, deci, că în membrana eritrocitelor există *structuri asemănătoare cu porii*. Cu toate acestea, dacă există, în concordanţă cu modelul de mozaic fluid al membranelor, apă se va deplasa, în paralel, atât prin pori cât şi prin bistratul lipidic.

Experimentele sugerează că raportul **Pf/Pd** pentru pori separat este 10, 90% din fluxul de apă se face prin pori, în timp ce 10% trece prin bistratul lipidic (98).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Experimentele au sugerat existenţa porilor pentru apă, de fapt, canale proteice. Aplicarea biologiei moleculare a avut ca rezultat clonarea expresiei mai multor membri ai unei familii de *canale de apă numite aquaporine.*

Aquaporinele (AQP) sunt în relaţie cu familia proteinelor membranare integrale, având o omologie de 20 – 40%. Primul canal de apă a fost clonat în 1991, iar proteina a fost numită aquaporina-1 (AQP1). AQP1 este un polipeptid cu 269 aminoacizi, având şase domenii transmembranare. Conformaţional, pare a fi o structură tetramerică legată noncovalent, fiecare monomer AQP formând un por independent funcţional.

Există aproximativ 2 x 10^5 molecule de AQP1 per eritrocit (98), ceea ce înseamnă o densitate a porilor de 1500 AQP1/μm^2, dar în ciuda acestei densităţi crescute a porilor, permeabilitatea pentru apă a globulelor roşii umane este de numai 10 până la 50 de ori mai mare decat cea a unui bistrat fosfatidilcolină/colesterol (98). Tot mai multe aquaporine sunt descoperite astăzi la mamifere, cu diferite localizări tisulare.

Tabelul VII.5.3.4.1. Familia aquaporinelor

	Situsuri majore de expresie	*Comentarii (după R. Bowen)*
Aquaporina 0	Ochi: celulele fibrelor cristaliene	Echilibrul fluidelor în interiorul cristalinului
Aquaporina 1	Hematii	Protecţie osmotică
	Rinichi: tubul proximal	Concentrarea urinii
	Ochi: epiteliul ciliar	Producerea de umoare apoasă
	Creier: plexuri coroide	Producerea lichidului cerebrospinal
	Plămân: celulele epiteliale alveolare	Hidratarea alveolară
Aquaporina 2	Rinichi: tubi colectori	Mediază activitatea hormonului antidiuretic
Aquaporina 3 *	Rinichi: tubi colectori	Reabsorbţia apei
	Trahee: celule epiteliale	Secreţia de fluid traheal
Aquaporina 4	Rinichi: tubi colectori	Reabsorbţia apei
	Creier: celule ependimare	Echilibrul fluidului CRS
	Creier: hipotalamus	Funcţie de osmoză ?
	Plămân: epiteliul bronsic	Secreţia de fluid bronşic
Aquaporina 5	Glande salivare	Producţia de salivă
	Glande lacrimale	Producţia de lacrimi
Aquaporina 6	Rinichi	Permeabilitate foarte scazută a apei; funcţie?
Aquaporina7	Testicul şi spermă	
Aquaporina 8	Testicul, pancreas, ficat, altele	
Aquaporina 9 *	Leucocite	

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.5.3.5. Echilibrul Donnan

Unii ioni nu pot străbate membrana, astfel încât se poate spune că membranele pot fi permeabile pentru anumiţi ioni şi impermeabile pentru alţii. Într-o astfel de situaţie, se va stabili un echilibru între ionii de pe cele două feţe ale membranei, numit *echilibrul* ***Donnan.***

Dacă luăm în considerare o membrană care separă două compartimente, unul cu o soluţie de K^+, respectiv celălalt cu o soluţie de Cl^- (concentraţii diferite de K^+ si Cl^-), pot fi scrise urmatoarele ecuaţii (derivate din ecuaţia lui ***Nernst***):

$$-\frac{RT}{F} ln \left[\frac{K^+_{in}}{K^+_{ex}}\right] = \frac{RT}{F} ln \left[\frac{Cl^-_{in}}{Cl^-_{ex}}\right]$$

adică :

$$\left[K^+_{in}\right]\left[Cl^-_{ex}\right] = \left[K^+_{ex}\right]\left[Cl^-_{in}\right]$$

Ultima ecuaţie descrie *echilibrul membranar* ***Donnan****: creşterea internă a concentraţiilor ionilor de semn opus pentru care membrana este permeabilă este egală cu creşterea concentraţiilor externe pentru aceeaşi ioni, în condiţiile în care nu există ioni care să nu traverseze membrana.*

VII.5.4. Transportul activ

VII.5.4.1. Pompele ionice

Transportul activ primar este reprezentat de sisteme de transport membranar ("pompe") care fac posibil schimbul ionic între interiorul şi exteriorul celulei, în relaţie cu transformarea moleculelor de ATP în ADP, oxigen dependent.

În relaţie cu analogia structurală, sunt cunoscute trei tipuri de ATP-aze:

- ATP-aza de tip P, include pompele de Na^+-K^+, Ca^{++}
- ATP-aza de tip F: în special în membrana mitocondriilor
- ATP-aza de tip V: în vezicule, pentru a menţine pH-ul.

ATP-azele de tip P se împart în două clase, având aceeaşi origine, dar cu diferenţe în ceea ce priveşte domeniile terminale asociate N- şi C- (98): un domeniu N-terminal mai mare, dar cu un domeniu C-terminal mic în tipul I faţă de tipul II.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

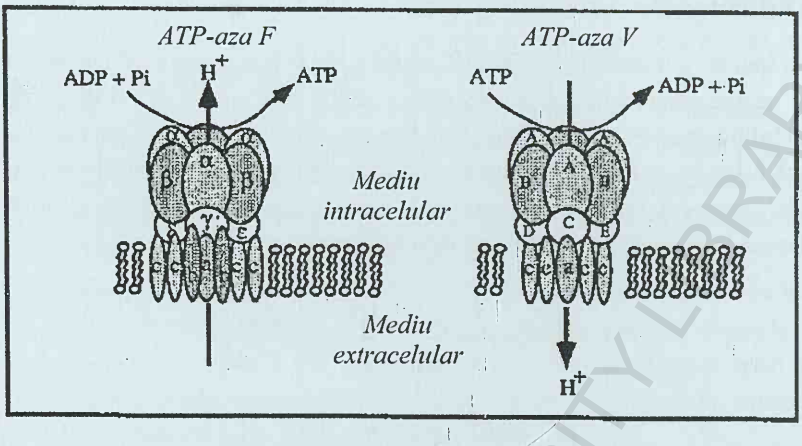


Figura VII.5.4.1.1.Tipurile 'F' şi 'V' de ATP-ază (96)

La tipul II de ATP-ază P, atât membrana cât şi domeniile extramembranare, fac parte din acelaşi lanţ polipeptidic. De obicei, domeniile citoplasmatice ale acesteia sunt compuse dintr-un domeniu larg C, o altă regiune B şi o regiune 'balama'.

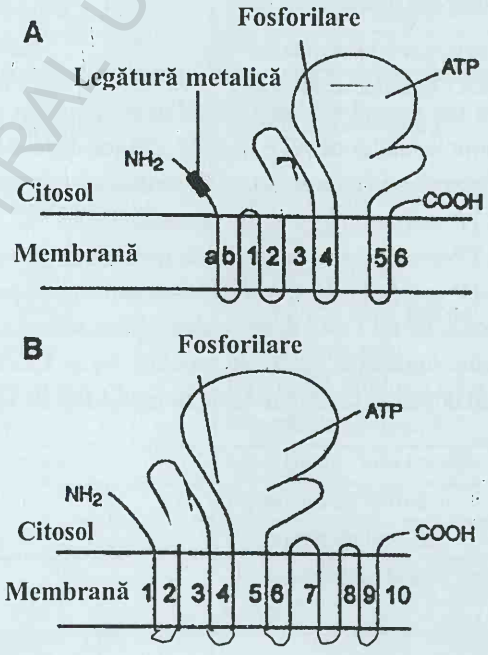


Figura VII.5.4.1.2. Comparaţie între structura propusă de Tipul I (A) şi cea de tipul II (B) de ATP-ază (Van Winckle LJ, 1999, modificat) – (118)

Cozile citoplasmatice ale terminaţiilor N- şi C- pot fi implicate în reglarea acesteia, în funcţie de tipul de ATP-ază. Există chiar şi variaţii structurale relativ mici între diferite

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

variante de ATP-ază de tip II, ceea ce determină diferenţe clare între particularităţile ATP-azelor în transport şi reglare. În tipul II de P-ATPază sunt incluse: Na^+/K^+, H^+/K^+ Ca^{2+}, H^+ ATP-aza.

ATP-azele cationice

Cele mai importante ATP-aze în celulele animale sunt Na^+/K^+-ATP-aza şi Ca^{2+}-ATP-aza. Au fost evidenţiate secvenţele de aminoacizi ale unui număr de ATP-aze de sodiu (Na^+/K^+-ATPaza), calciu (Ca^{2+}-ATPaza) şi ATP-aza de protoni, în celulele animale şi pompe de K^+ în bacterii.

Na^+-K^+-ATPaza

Aceasta este un sistem de transport activ prezent în cele mai multe celule ale mamiferelor. Este reprezentată de o proteină membranară integrală cu două subunităţi: α şi β. Subunitatea α prezintă o capacitate mare de conservare între specii; secvenţa polipeptidică traversează de opt ori membrana. În schimb, subunitatea β este o glicoproteină care străbate bistratul lipidic membranar o singură dată, cu o scurtă prelungire, 2-3 kDa, în citoplasmă care are funcţie incertă. Se pare că există cel puţin trei gene care codifică subunitatea α şi două izoforme ale subunităţii β, astfel încât există cel puţin şase posibili dimeri enzimatici.

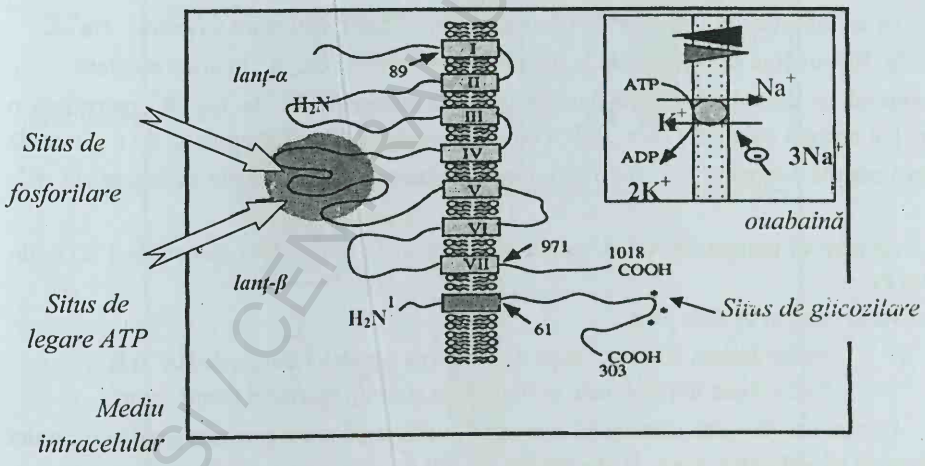


Figura VII.5.4.1.3. Structura Na^+/K^+-ATP-azei (96)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

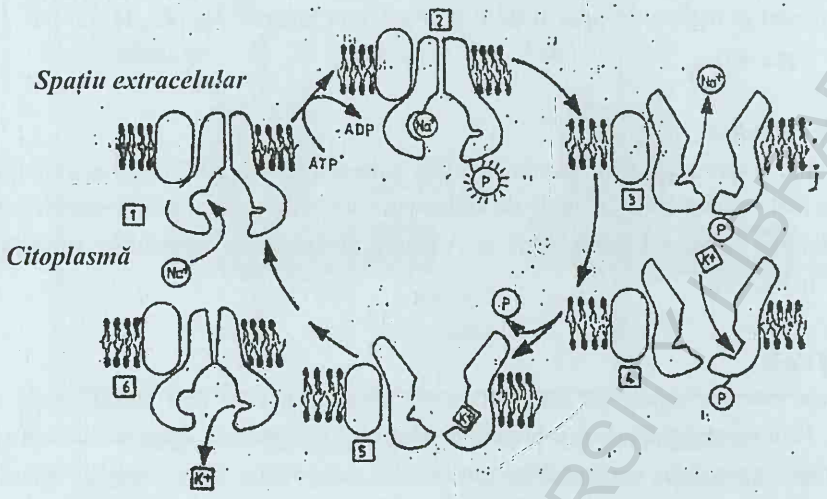


Figura VII.5.4.1.4. Mecanismul de funcţionare al Na^+ - K^+ ATP-azei (V.Rusu et al, 87)

Transportul ionic este electrogen şi asimetric: pentru fiecare moleculă de ATP hidrolizată, trei ioni de Na^+ sunt transportaţi extracelular şi doi ioni de K^+ pătrund în celulă, cu un turnover de 100 ATP pe secundă. Pentru buna funcţionare a pompei Na^+-K^+, ionii de Na^+ trebuie să fie prezenţi în interiorul celulei şi cei de K^+ în afara acesteia.

S-a apreciat că energia necesară funcţionării pompelor celulare de Na^+-K^+ reprezintă o treime din energia celulară *(Tien, 108)*. Pompa este inhibată în mod specific de o glicozidă cardiacă numită ouabaina (10^{-8} mol) care blochează competitiv situsurile de legare ale K^+-ului.

Se pare că pompa de Na^+-K^+ poate funcţiona şi în sens invers, sintetizând ATP din ADP şi Pi.

Activarea pompei se face prin:

- redistribuirea Na^+ si K^+ dupa deschiderea canalelor ionice de Na^+ şi K^+;
- fosforilarea intracelulară, în funcţie de anumiţi receptori membranari.

Pompa Na^+-K^+ este principalul mecanism utilizat pentru a menţine gradienţii ionici membranari ai celulelor, care, la rândul lor, au rol în păstrarea potenţialului membranar, transportului de nutrienţi (zahăr, aminoacizi etc.) şi chiar a volumului celulei.

Na^+/K^+-ATPaza are modalităţi de distribuţie specifice pe suprafeţele celulelor animale, reflectând funcţia. În celulele neepiteliale, de exemplu fibroblastele, enzima este distribuită uniform pe suprafaţa celulei, în timp ce în celulele epiteliale localizarea enzimei la polul bazolateral stă la baza transportului vectorial în ţesuturi al sărurilor, apei, substanţelor dizolvate organice (de exemplu acizi biliari). Numărul pompelor funcţionale poate fi diferit în funcţie de tipul de celulă.

DSP IASI / CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

Ca^{2+}-ATPaza

Ca^{2+}-ATPaza (studii pe reticulul sarcoplasmatic al mușchiului striat de iepure) este o proteină de 110-kDa a cărei principala caracteristică este o structură numită *cap citoplasmatic*. Este o porțiune globulară, proeminentă constând din aproximativ 500 de aminoacizi cu un aranjament complex de structuri α helix și β pliat. Acest *cap* conține domeniile de legare și fosforilare ale ATP-ului. Dupa legarea și hidroliza ATP-ului, energia eliberată este transferată printr-un domeniu de transducție către un domeniu de legare pentru Ca^{2+}. Rezultatul net este transportul Ca^{2+}-ului prin bistratul lipidic în lumen. Afinitatea crescută a domeniului de legare al Ca^{2+} este în jurul bazei *capului*, în apropierea bistratului lipidic și a secvențelor de aminoacizi unde se realizează transportul ionic specific. Legarea Ca^{2+}-ului și fosforilarea concomitentă a enzimei conduc la transportul ionilor în lumen printr-un canal nespecific. În modelul prezentat în figura de mai jos, opt din domeniile transmembranare fixează Ca^{2+}-ATPaza în interiorul bistratului lipidic.

Există similitudine în secvența aminoacizilor de legare a ATP, fosforilare și regiunile ATP-azice transportatoare de ioni. Cu toate acestea, diferențele apar la nivelul regiunilor de legare a ionilor și în acele regiuni în care ionii sunt transportați prin membrană. De exemplu, există aproximativ 60% asemănare între Ca^{2+}-ATP-ază și subunitatea α a Na^+/K^+-ATP-azei, oferind astfel o dovadă moleculară asupra unei origini comune în evoluția lor.

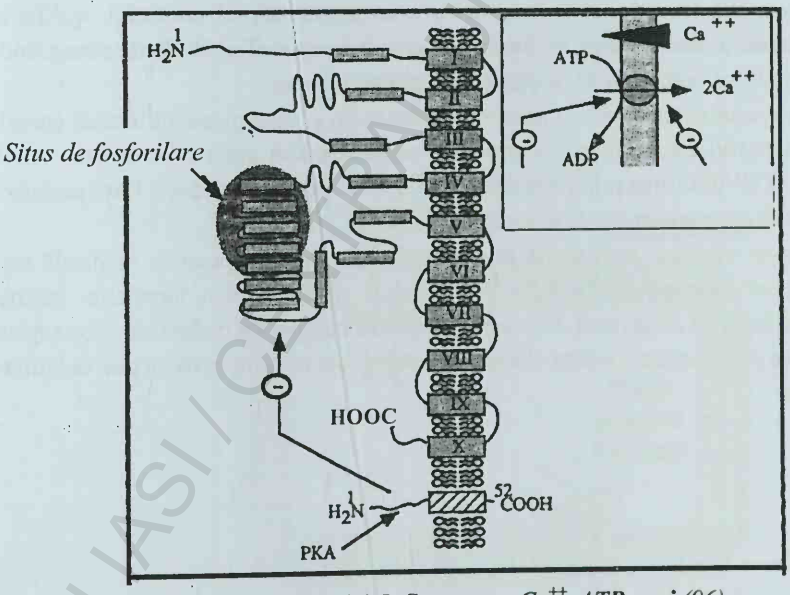


Figura VII.5.4.1.5. Structura Ca^{++}-ATP-azei (96)

ATP-aza de protoni

Diferite ATP-aze controlează concentrațiile protonilor în compartimentele celulare și organite. Forța motrice protonică joacă un rol major în procesele mitocondriale și fotosintetice. ATP-azele de protoni sunt prezente în bacterii, mitocondrii și cloroplaste și sunt clasificate în trei categorii principale (tabelul de mai jos).

BCU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR

Tabelul VII.5.4.1.1. Comparaţie între tipurile de ATP-aze protonice

Proprietăţi/tipuri	*Vacuolar*	*Bacterian/ Mitocondrial*	*Membrana plasmatică*
Mărime (kDa)	200-500	450-550	100
Subunităţi	3-8	8-12	1
Electrogen	Da	Da	Da
Inhibitori	*N*-etilmaleimida	Oligomicina	Vanadat
	Nitrat	Azida	
Ioni transportaţi	Cl^-	-	K^+
Fosforilat intermediar	Nu	Nu	Da

Pompele de protoni vacuolare sunt prezente în organite conectate la sistemul vacuolar al celulelor eucariote şi sunt, de asemenea, găsite la bacterii, ciuperci şi plante cu vacuole. Ele functionează prin pomparea controlată a protonilor în organite, cu acidifierea interiorului acestora şi a veziculelor membranare, generând energie protonică ce poate fi utilizată pentru un proces de absorbţie secundar. În lizozomi, pompa de protoni scade pH-ul din lumen la aproximativ 5, care reprezintă pH-ul optim al majorităţii enzimelor lizozomale. Pompele protonice mai acidifiază interiorul compartimentului endocitic şi *aparatului Golgi*. Mişcarea de exocitoză (secretorie) a veziculelor este dependentă de controlul acidifierii. ATP-aza de protoni a fost studiată în detaliu în granulele cromafine suprarenaliene unde generează forţa motrice responsabilă de absorbţia catecolaminelor.

Pompele protonice prezente în bacterii, mitocondrii şi cloroplaste utilizează energia generată de transportul electronilor mitocondriali şi fotosintetici pentru fosforilarea ADP-ului. În bacterii, ATP-ul format prin fermentare este utilizat pentru a genera o forţă protonică ce va fi utilizată de catre sistemele de absorbţie secundare.

De departe cea mai importantă pompă de protoni pentru practica medicală este *pompa de protoni din epiteliul gastric,* responsabilă de acidifierea lumenului gastric. Aceasta este inhibată de *omeprazol*, care este şi reprezentant pentru o clasă de substanţe ce pot fi utilizate ca medicamente pentru afecţiuni gastrice care se caracterizează prin acidifiere gastrică în exces.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.5.4.2. Transportul activ secundar

În acest caz există un transport transmembranar al unei specii (zaharuri, aminoacizi, unii ioni etc.) în relație cu gradientul electrochimic care este rezultat al unui transport activ primar.

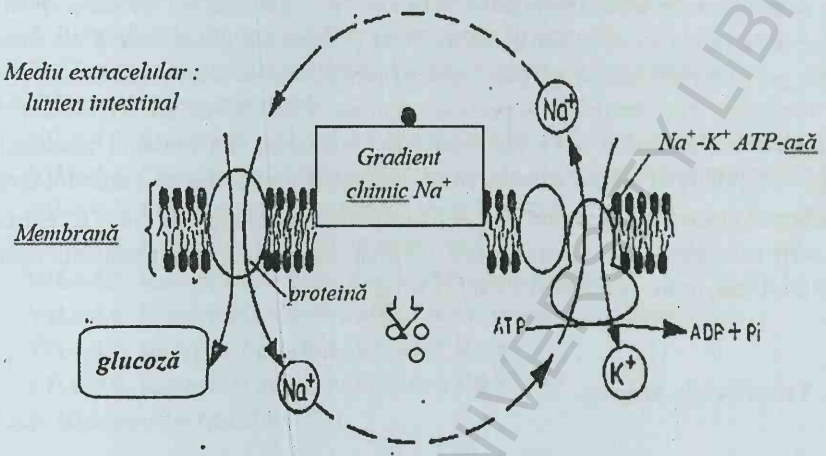


Figura VII.5.4.2.1. Transportul activ secundar Na^+-glucoză este asociat cu o Na^+-K^+ ATP-ază (87)

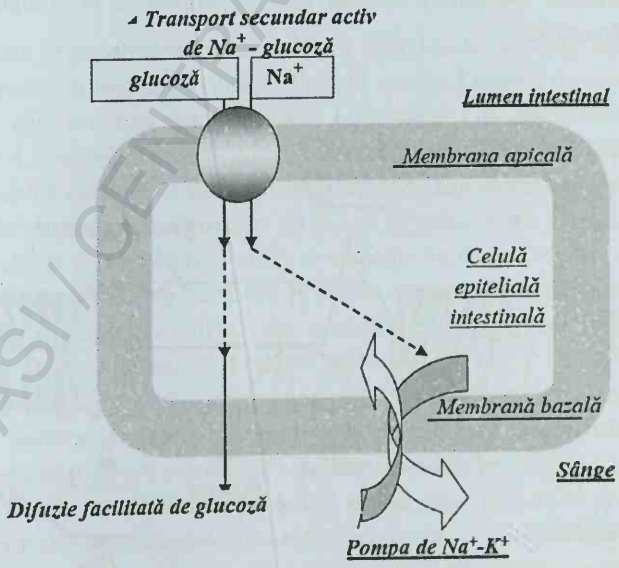


Figura VII.5.4.2.2. Distribuția asimetrică a sistemelor de transport implicate în transportul transcelular al glucozei în celulele epiteliale intestinale (87)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Întrucât acesta utilizează, de fapt, energia de la un transport activ primar, este, prin urmare, tot un transport activ. În cazul în care transportul primar este inhibat, se opreşte şi transportul activ secundar. Acest tip de transport a fost descoperit în anumite ţesuturi cum ar fi ţesutul epitelial intestinal şi la nivel renal, unde mediază reabsorbţia glucozei şi a aminoacizilor, precum şi reabsorbţia fosfatului, sulfatului, bicarbonatului şi a ionilor de calciu.

Un exemplu este transportul activ secundar Na^+ - glucoză, în celulele epiteliale intestinale. Aceste celule au un transport transcelular al glucozei: glucoza intră din intestin în celulă prin porţiunea apicală, iar, pe polul opus al celulei, are loc efluxul glucozei.

În membrana citoplasmatică a porţiunii apicale a celulei există o proteină care mediază simportul (transportul activ secundar) Na^+ - glucoză din lumenul intestinal în interiorul celulei epiteliului intestinal, astfel încât concentraţia intracelulară a ambilor creşte.

Gradientul electrochimic pentru Na^+ este menţinut prin pompele de Na^+ - K^+ existente pe aceeaşi parte a membranei. De partea opusă, glucoza iese, în funcţie de gradientul chimic, prin difuzie facilitată, printr-un transportor de glucoză.

VII.5.4.3. Translocaţia de grup

Acest tip de transport se referă la transportul transmembranar al unor specii moleculare cu modificarea structurii lor chimice, realizând o legatură covalentă între specia transportată şi o componentă membranară implicată în acest transport.

De exemplu, la unele bacterii, glucoza este transportată în celulă, fiind în acelasi timp fosforilată. Întrucât membrana celulară este impermeabilă la compusul fosforilat, acesta va fi reţinut în celulă.

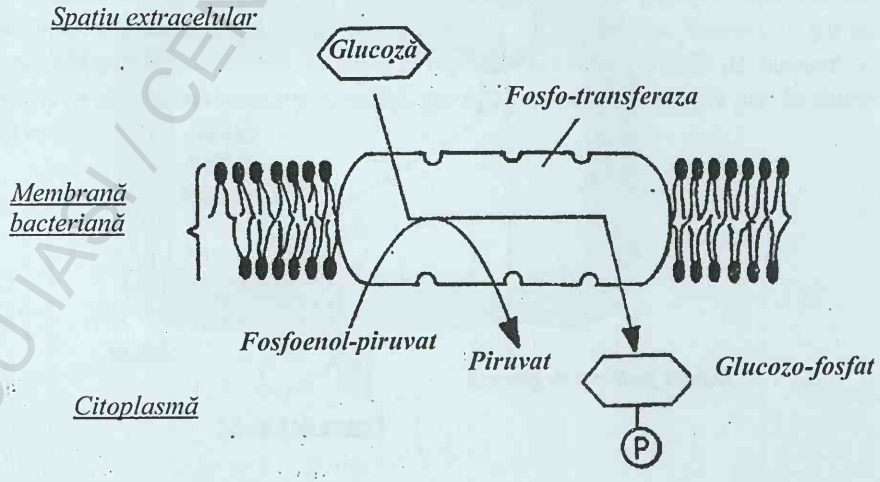


Figura VII.5.4.3.1. Schema proceselor de translocaţie de grup (V.Rusu et al, 87)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.6. Teoria comunicării intercelulare

VII.6.1. Componentele unui sistem de comunicare intercelulară
VII.6.2. Principalele modalităţi de transmitere a informaţiei
VII.6.3. Clasificare şi caracteristici generale ale receptorilor celulari
VII.6.4. Receptori membranari
VII.6.4.1. Structura moleculară generală a receptorilor membranari
VII.6.4.2. Caracteristici funcţionale generale ale receptorilor membranari
VII.6.4.3. Clasificarea receptorilor membranari
VII.6.4.4. Receptori asociaţi cu proteina G
VII.6.4.5. Receptori cu generare de mesageri secundari
VII.6.4.6. Receptori cu activitate protein-kinazică intrinsecă
VII.6.4.7. Receptori asociaţi canalelor ionice
VII.6.4.8. Receptori de internalizare a liganzilor
VII.6.5. Receptori intracelulari

VII.6.1. Componentele unui sistem de comunicare intercelulară

Capacitatea organismelor sau a celulelor individuale din care sunt alcătuite de a detecta şi a răspunde la fluctuaţiile din mediu este esenţială pentru supravieţuirea acestora. Organismele vii sunt compuse dintr-un număr impresionant de celule care nu sunt izolate, nici spaţial şi nici funcţional: acestea comunică. Celulele trebuie să fie capabile să sesizeze prezenţa moleculelor din mediul extracelular precum şi alte modificări externe sau interne organismului (de exemplu a unor factori fizici), şi să poată emite răspunsuri intracelulare riguros coordonate şi sub un control strict al etapelor implicate. Pentru a se realiza acest deziderat al organismelor vii, s-a dezvoltat un sistem complex de semnale recognoscibile, fie ele fluctuaţii ale condiţiilor nutritive din mediul extracelular sau modificări de ordin informaţional (printr-o diversitate de mesageri moleculari).

Deşi într-un organism complex numărul moleculelor de detectat şi transmis este foarte mare, există **un pattern general al sistemului de comunicare intercelulară** format din: o moleculă (**mesagerul primar**) secretat de o celulă, un mediu pe care îl va parcurge sau, prin proximitate, va acţiona în mod direct pe **o altă celulă** (care trebuie să prezinte o structură specifică ce va permite acţiunea moleculei mesager primar).

În funcţie de mesagerul primar şi mediul în care este secretat, se pot distinge câteva modele de semnalizare intercelulară.

Părţile componente ale sistemului de comunicare intercelulară sunt ilustrate în urmatoarea diagramă:

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY
B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

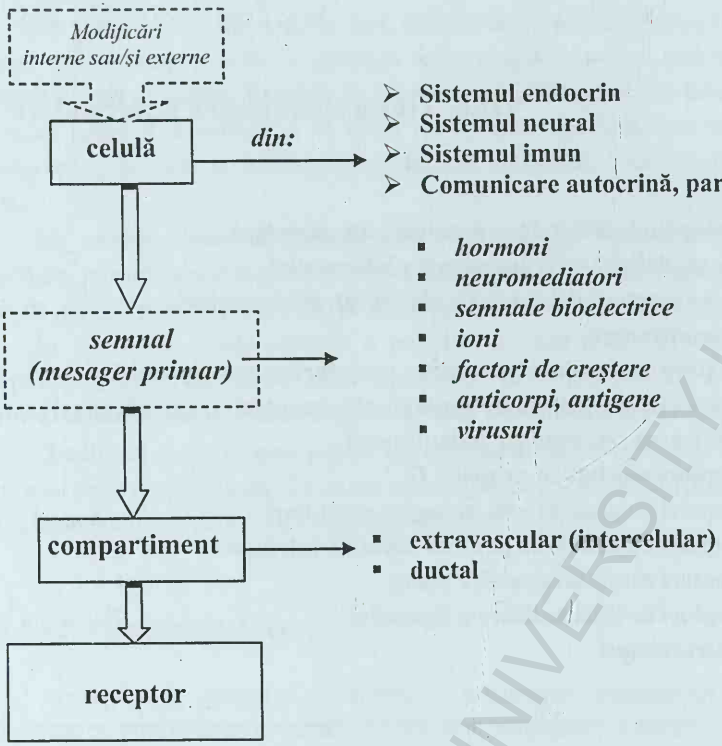


Figura VII.6.1.1. Părțile componente ale unui sistem de comunicare intercelulară

Mesagerul primar

Într-un organism viu există un trafic continuu a numeroase tipuri de molecule (de dimensiuni mici sau mari) care acționează pe diverse tipuri de celule, fiind generic denumite *mesageri primari*, de exemplu hormonii, factorii de creștere, neurotransmițătorii etc.

Hormonii sunt **mesageri endocrini** produși de celulele endocrine ale unor formațiuni insulare sau glandulare și sunt eliberați (secretați) în torentul sangvin, de regulă, pentru a fi transportați în organism la celulele țintă, care vor prezenta structurile specifice cu care să interacționeze, **receptorii.**

Neurotransmițătorii acționează la nivelul spațiului sinaptic, în timp ce ionii sunt transportați intracelular prin sisteme de microtransport transmembranar.

Mediatorii paracrini, printre care se numără majoritatea factorilor de creștere polipeptidici, unele amine și prostaglandinele, nu sunt deversați și transportați în sânge ci în mediul extracelular, unde vor acționa direct pe celulele vecine.

Mediatorii autocrini acționează pe aceleași celule care i-au și secretat.

VII.6.2. Principalele modalități de transmitere a informației

Informația poate fi transmisă între celule prin sisteme diferite. Aceasta poate fi transmisă fie pe distanțe scurte, fie pe distanțe lungi, uneori chiar impresionant de lungi, de ordinul metrilor, la celule de alt tip, ultraspecializate funcțional.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

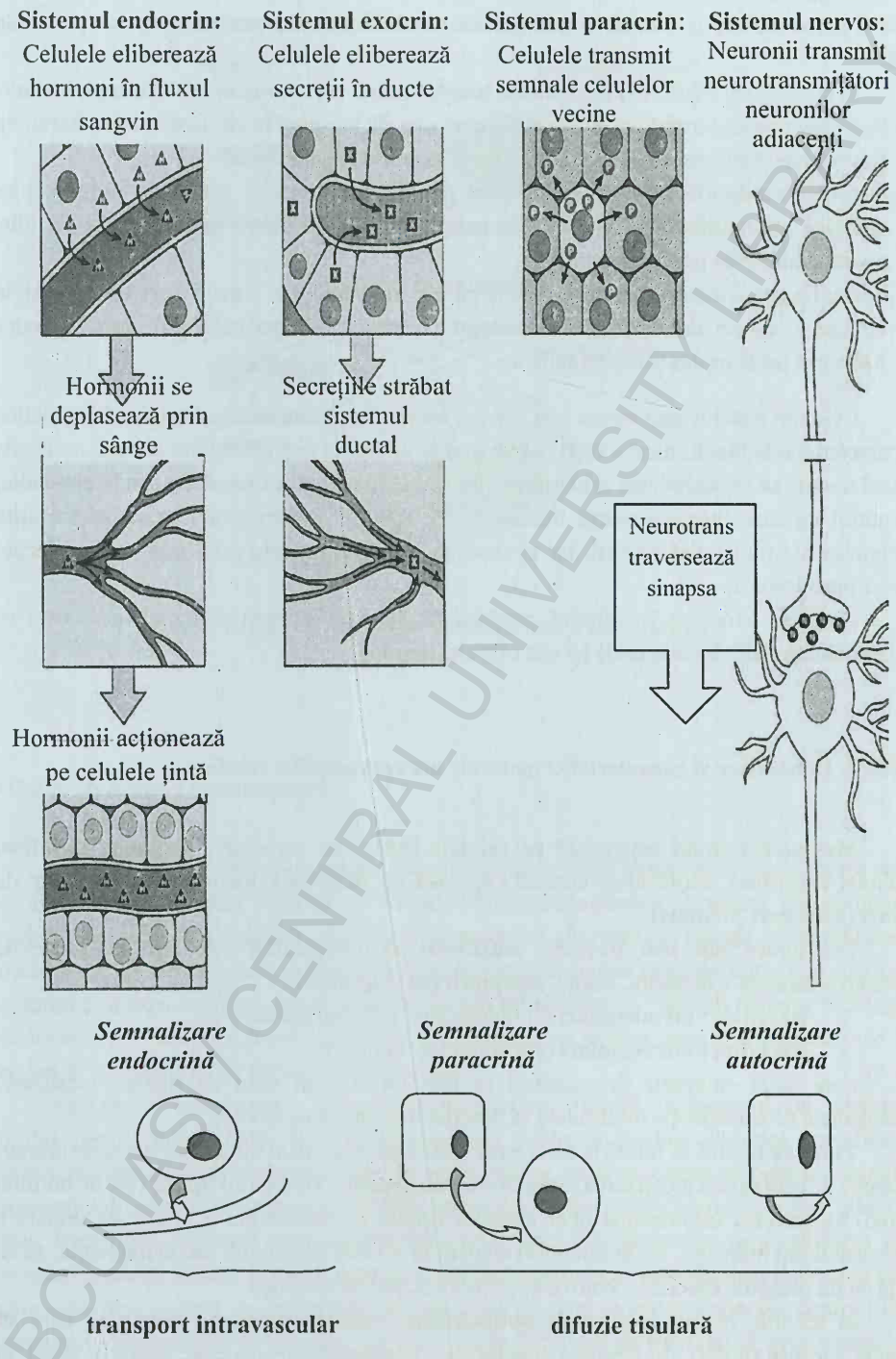


Figura VII.6.2.1. Tipuri de sisteme de comunicare intercelulară

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Semnalizarea (chimică) pe **distanţe scurte,** numită şi ***comunicare de vecinătate,*** poate fi paracrină sau autocrină şi nu necesită sistemul vascular pentru a acţiona pe celula ţintă.

Semnalizarea (chimică) pe **distanţe lungi,** numită şi ***comunicare la distanţă,*** include:

- Semnalizarea endocrină: glandele endocrine secretă hormoni în circulaţie; apoi, hormonii sunt transportaţi spre celulele ţintă, unde-şi exercită efectele.
- Neuronii transportă semnale moleculare pe distanţe lungi ca urmare a proprietăţilor electrice ale membranei celulare; semnalele moleculare dintre neuroni şi celula ţintă poartă numele de neurotransmiţători.
- Semnalizarea imună presupune interacţiunea unui antigen, care a fost transportat în circulaţie, cu un anticorp specific, ataşat pe suprafaţa unei celule şi care împreună formează un complex antigen-anticorp.

Cele trei sisteme enumerate mai sus par a avea în comun aceleaşi origini filogenetice iar caracteristicile biochimice şi moleculare sunt similare: în cadrul fiecărui sistem, molecula semnal trebuie să fie sintetizată şi eliminată din celulă în mediul extracelular sau în circulaţie, receptorul cu care interacţionează trebuie să fie specific pentru structura şi proprietăţile biochimice ale moleculei semnal, iar consecinţa interacţiunii este activarea unei molecule efector postreceptor.

Glandele exocrine îşi elimină produşii de secreţie în spaţiile ductale prin care se deplasează către altă locaţie unde îşi vor exercita acţiunea.

VII.6.3. Clasificare şi caracteristici generale ale receptorilor celulari

Mesagerii primari acţionează pe celulele ţintă prin structuri peptidice specifice, denumite **receptori**. Moleculele care se cuplează cu receptorii poartă numele generic de **liganzi (mesageri primari).**

Una dintre cele mai frecvente clasificări ale receptorilor este cea în funcţie de localizarea celulară a acestora. Astfel, receptorii pot fi grupaţi în:

- **Receptori membranari** (ai membranei citoplasmatice)
- **Receptori intracelulari** (citosolici sau nucleari)

Cele două categorii de receptori se deosebesc prin: tipul de ligand, localizare, mecanismele de transducţie moleculară şi funcţiile pe care le deservesc.

Tipul de ligand se referă la caracterul lipofil sau hidrofil al moleculei mesager primar, în funcţie de care diferă localizarea receptorului său specific. **Un ligand lipofil** (ex. un hormon steroid) va traversa întotdeauna liber bistratul lipidic al membranei celulare, ca urmare a caracterului său hidrofob, iar în interiorul celulei, la nivelul citosolului sau al nucleului, se va cupla cu un receptor specific, pentru a-şi exercita acţiunea specifică.

În schimb, pentru **moleculele polipeptidice** (unii hormoni, de exemplu), care au caracter hidrofil (polar), traversarea membranei citoplasmatice nu este posibilă decât în prezenţa unui receptor specific membranar.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

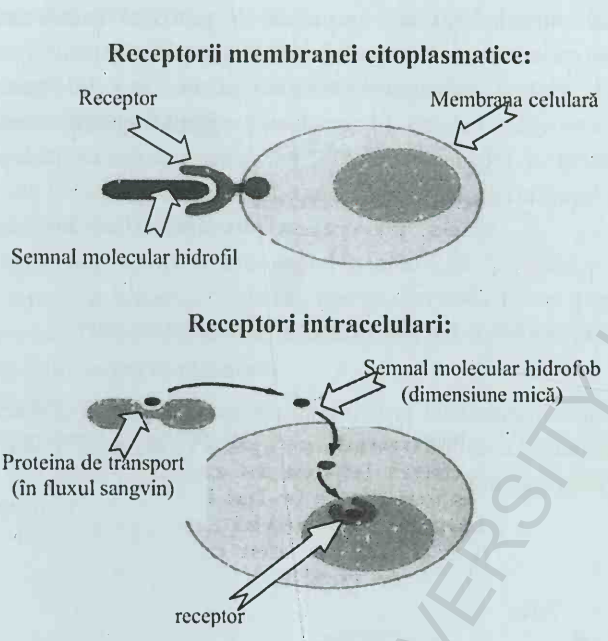


Figura VII.6.3.1. Receptori membranari și intracelulari

VII.6.4. Receptori membranari

Din categoria proteinelor membranare, receptorii membranari sunt unele dintre cele mai importante structuri biologice. Aceştia sunt preponderent structuri glicoproteice localizate pe suprafaţa celulară, dar există şi receptori *de rezervă,* stocaţi în membranele intracelulare. Receptorii sunt esenţiali în transducţia unei palete mari de stimuli şi semnale (ex. lumină, miros, hormoni, medicamente, factori de creştere ...) într-un răspuns fiziologic coordonat. Transducţia semnalului implică, în general, activarea unor enzime ancorate în membrană şi generarea de **mesageri secundari.**

Receptorii membranari îndeplinesc numeroase **funcţii.** Conceptul de receptor, introdus pentru prima dată de către farmacologi pentru a explica acţiunea specifică a neurotransmiţătorilor şi farmaceuticelor la nivel celular, ulterior extins şi pentru a explica mecanismul de acţiune la suprafaţa celulară a polipeptidelor şi a altor hormoni, a fost, ulterior, extins. Receptorii **reglează permeabilitatea** membranei citoplasmatice prin inhibarea sau activarea canalelor ionice. O altă funcţie este cea de **transport al proteinelor,** după cum este demonstrat, de exemplu, de internalizarea ligandului de către receptorul specific pentru LDL (low-density lipoprotein) în lizozomi, de captarea de fier, legat de transferină, prin receptorul pentru transferină, şi de transferul transcelular, din sânge către alte compartimente ale organismului, a imunoglobulinelor polimerizate, de exemplu. Receptorii din familia

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

integrinelor **conectează citoscheletul la componentele matricei extracelulare** iar alţi receptori, ca de exemplu caderinele de la suprafaţa celulară, au diferite roluri în interacţiunile celulă-celulă. De altfel, până şi unii **agenţi patogeni** pătrund în celule prin intermediul identificării şi legării de receptori celulari. În consecinţă, o gamă largă de virusuri cu înveliş, toxine bacteriene, paraziţi şi lectine din plante, ca ricina sau abrina, folosesc căile de endocitoză mediată de receptori pentru a intra în interiorul celului.

VII.6.4.1. Structura moleculară generală a receptorilor membranari

Toţi receptorii membranari sunt proteine membranare integrale, globulare, care pot traversa o singură dată sau de mai multe ori (clasa III sau IV) bistratul lipidic membranar. Toţi receptorii membranari sunt alcătuiţi din **3 domenii**:

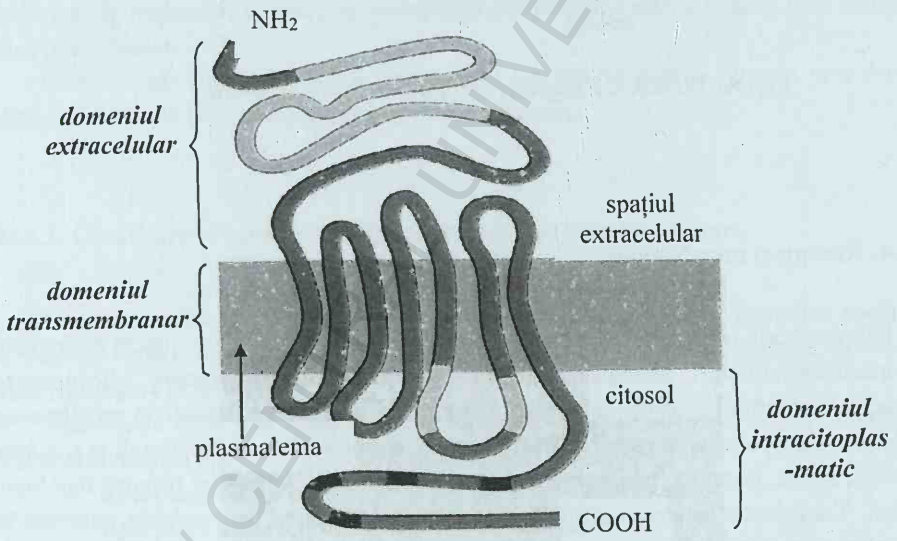


Figura VII.6.4.1.1. Reprezentare schematică a celor 3 domenii structurale ale unui receptor membranar

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a. Domeniul extracelular
- conţine situsul de ataşare a ligandului
- reprezintă cea mai mare parte a structurii proteice
- conţine complexe de oligozaharide
- poate conţine cisteină
- aici sunt localizate secvenţele de omologie.

b. Domeniul transmembranar:
- este o secvenţă scurtă de aminoacizi de aprox. 20 de unităţi
- caracterizat de prezenţa unuia sau mai multor α–helix-uri transmembranare
- are grad înalt de conservare structural şi este porţiunea cea mai stabilă a receptorului

c. Domeniul intracitoplasmatic:
- are dimensiuni variabile
- poate conţine un situs enzimatic (de fosforilare)
- este domeniul răspunzător de transducţia semnalului şi de traficul intracelular al receptorilor.

VII.6.4.2. Caracteristicile funcţionale generale ale receptorilor membranari

Specificitate (ligand/ţesut): un anumit ligand se va lega doar de un anumit receptor, un anumit receptor se va găsi doar într-un anumit ţesut. Această proprietate poate fi studiată, în mod direct, prin metode *in vitro* şi, indirect, prin metode *in vivo*, fiind o abordare funcţională prin care sunt cuantificate efectele interacţiunii ligand-receptor.

Afinitatea: afinitatea de legare a ligandului la situsul receptorului poate fi cuantificată prin metode radioizotopice, prin marcarea ligandului cu un radioizotop. Această metodă se desfaşoară în mai multe etape, incluzând

a) incubarea receptorilor celulari cu un ligand specific radiomarcat (cu radioizotopi ca I-125, H-3, C-14), într-un mediu controlat, cu temperatură, pH şi interval de expunere prestabilite. Legarea ligandului de receptor este guvernată de *principiul acţiune-masă*:

$$L^* + R \underset{K_1}{\overset{K_{-1}}{\rightleftharpoons}} L^*R$$

unde: L - radioligand, R – receptor, L*R - complex radioligand-receptor, K_1 - constantă de asociere, K_{-1} - constantă de disociere*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Când sistemul este în echilibru se poate scrie:

$$\frac{[L^*][R]}{[L^*R]} = \frac{K_{-1}}{K_1} = K_D$$

b) separarea complexelor receptor-radioligand (L^*R) de radioligandul liber (L^*), printr-o metodă de separare (ex. centrifugare, filtrare).

c) măsurarea radioactivității (impulsuri pe minut) fracției în care s-au separat complexele radioligand-receptor.

Chiar dacă cea mai importantă cuplare dintre radioligand și receptor este cea specifică, se pot produce, totuși, și asocieri nonspecifice. Legarea specifică este un proces cu cinetică saturabilă, deoarece numărul de situsuri de pe receptorii din probă este limitat. Legarea nespecifică presupune legarea ligandului de alte structuri, non-receptor (cu o afinitate foarte mică și cu o cinetică nesaturabilă). Acest fenomen poate fi pus în evidență prin incubarea radioligandului în condiții de ligand nemarcat în excess, care va ocupa toate situsurile receptorului. Legarea totală (specifică și nespecifică) este suma celor două tipuri de interacțiuni ale ligandului.

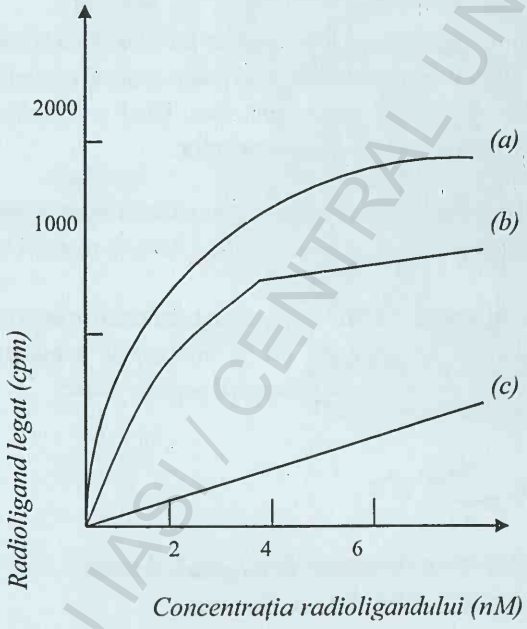


Figura VII.6.4.2.1. Grafic de saturație, în care este figurată legarea totală (a), specifică (b) și nespecifică (c) (66)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Constanta de disociere finală *(K_D)* este definită ca fiind concentraţia de radioligand necesară pentru a ocupa 50% din toată populaţia de receptori. Afinitatea pentru receptor a radioligandului este mare atunci când K_D creşte.

1. **Mecanismul de legare**: ligandul se cuplează cu receptorul prin interacţiuni non-covalente, majoritatea fiind legături electrostatice: interacţiuni ionice, forţe van der Waals, legături de hidrogen, interacţiuni hidrofobe. Cuplarea nu implică legături covalente. Interacţiunile sunt slabe, electrostatice, tocmai pentru a da posibilitatea desfacerii complexului ligand- receptor după transmiterea mesajului (reversibilitate).

2. **Capacitatea de legare**: reprezintă numărul total de situsuri de legare. În procesele fiziologice, receptorii exprimaţi de o celulă pentru un anumit ligand sunt reglaţi în funcţie de concentraţia de ligand disponibilă, prin reducerea numărului (fenomen numit *down-regulation* - atunci când ligandul este în exces, celula exprimă mai puţini receptori) sau creşterea numărului (fenomen numit *up-regulation* - când ligandul este prezent în cantităţi mici, numărul receptorilor va creşte).

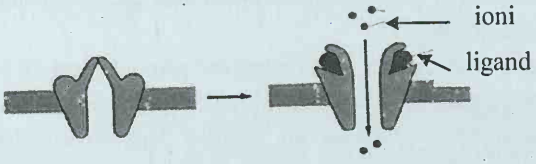
VII.6.4.3. Clasificarea receptorilor membranari

În funcţie de diverse variabile, cum ar fi structura moleculară, tipul de ligand legat, mecanismul de transducţie şi consecinţele metabolice, **receptorii pot fi clasificaţi în mai multe categorii.** Una dintre cele mai utilizate clasificări este cea care face referire la **mecanismul lor de transducţie.** Din această perspectivă, receptorii membranari pot fi separaţi în mai multe grupe:

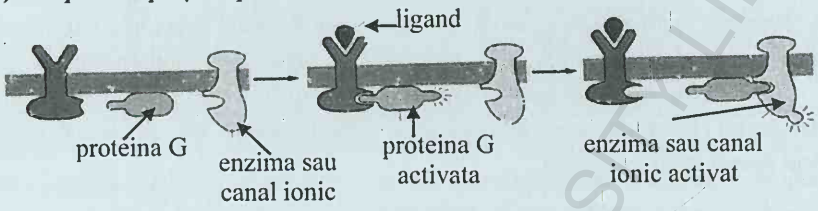
- asociaţi cu canale ionice (Na, Cl) - ex. nicotina, acetilcolina
- cu activitate protein-kinazică intrinsecă - ex. EGF (factor de creştere epidermică), insulina
- care inhibă sau activează adenilat-ciclaza - ex. TSH (tireotropina/hormone de stimulare tiroidiană), α-adrenergici
- care activează fosfolipaza C - ex. TRH (tireoliberina/hormonul de eliberare a TSH)
- care activează fosfolipaza A - ex. histamina
- care modulează răspunsul imun - ex. antigene, anticorpi
- prezenţi în matricea extracelulară - ex. fibronectina, integrina.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a) receptori cuplați cu canale ionice



b) receptori cuplați cu proteine G



c) receptori cu activitate protein-kinazică

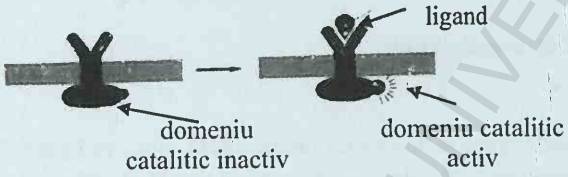


Figura VII.6.4.3.1. Tipuri de receptori membranari

În relație cu tipul de mesager secundar implicat în mecanismul de transducție al semnalului, receptorii membranari pot fi asociați cu:

- AMPc (adenozin mono-fosfat ciclic)
- IP_3 (inozitol trifosfat), DAG (diacil-glicerol)
- Ca^{2+}

O clasificare simplificată a receptorilor membranari, pe care o vom detalia mai jos, este:

- Receptori cuplați cu proteina G
- Receptori cuplați cu canale ionice
- Receptori cuplați cu enzime.

VII.6.4.4. Receptori asociați cu proteina G

Reprezintă o clasă de receptori membranari, în cazul cărora, în secvența de transducție a semnalului, prima etapă după cuplarea ligandului este **activarea unei proteine G**. Ulterior, mesajul este transmis pe diferite căi de semnalizare intracelulară.

Familia receptorilor asociați cu proteinele G este cea mai numeroasă: la mamifere, până în prezent, se cunosc mai mult de 100 de membri. Liganzii specifici acestui tip de receptori pot fi aminoacizi, proteine, ioni, lipide, nucleotide... dar, în același timp, același ligand poate activa mai mulți receptori. De exemplu, adrenalina - 9 receptori, acetilcolina -

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5 receptori, serotonina - 15 receptori. De regulă, receptorii cuplaţi cu proteina G au o structură similară: 7 regiuni α-helix transmembranare, alcătuite din 22-24 aminoacizi. Capătul N-terminal al polipeptidului se află pe versantul extern al membranei celulare, în timp ce capătul C-terminal este situat pe versantul intern, citosolic.

Acetilcolină	Oxitocină
Bradikinină	Hormoni paratiroidieni
Calcitonină	Prostaglandine
Dopamină	Retinal
Epinefrină (adrenalină)	Serotonină
Glucagonul	Somatostatină
Histamină	Trombină
Leucotrienele	Tirotropină
Neurotensină	Vasopresină

Tabel VII.6.4.4.1. Exemple de liganzi care acţionează prin receptori cuplaţi cu proteine G

În tabelul de mai sus sunt enumeraţi cei mai frecvenţi liganzi specifici receptorilor cuplaţi cu proteina G. Clasa de proteine G ataşate acestor receptori este reprezentată de proteinele G trimerice sau heterotrimerice (formate din subunităţile alfa, beta, gamma). Regiunea din receptor în care se leagă proteina G este cea de pe versantul citosolic al receptorului, intracelular.

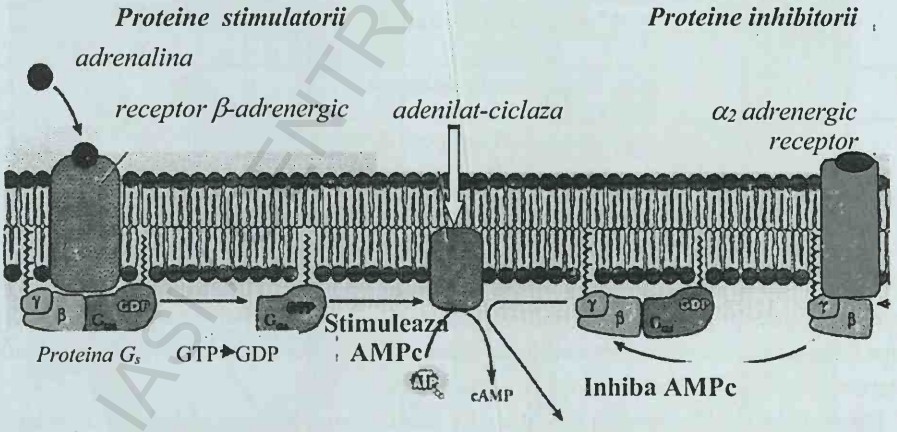


Figura VII.6.4.4.1. Unele proteine G sunt activatoare (ex. pentru receptorul β-adrenergic), altele sunt inhibitoare (ex. pentru receptorii α_2 adrenergici), în sinteza AMPc (107)

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Familia de proteine G

Proteinele G aparţin unei familii de transductori ai semnalului, fiind proteine reglatoare asociate cu Guanil-nucleotide, de unde şi provenienţa literei *G*. Ele sunt asociate în principal cu membrana citoplasmatică dar apar şi în membranele aparatului Golgi sau în membranele intracelulare. Au un grad înalt de conservare structurală între membrii familiei: molecule heterotrimerice formate dintr-o subunitate majoră alfa, de greutate moleculară variabilă (39-52 kDa) pe situsul căreia se leagă GTP (guanozin-trifosfat), şi alte 2 subunităţi minore, puternic interconectate, lanţurile beta (36 kDa) şi gamma (8 kDa).

Proteinele G sunt subgrupate în alte 4 subfamilii:

Tabel VII.6.4.4.2. Membrii familiei de proteine G

Familia	*Proteina G*	*Sub-uni-tatea*	*Funcţia*	*Factori care interferă cu proteina G (ex.)*
I	G_s	α_s	- stimulează adenilat-ciclaza stimulează canalele de Ca^{++}	*toxina holerică*
	G_{olf}	α_s	- stimulează adenilat-ciclaza	*toxina holerică*
II	G_0 G_i G_t	α_1	- stimulează canalele de K^+ inhibă canalele de Ca^{++}	*toxina Pertussis*
		α_0	- stimulează canalele de K^+ inhibă adenilat-ciclaza	*toxina Pertussis*
		α_t	- stimulează fosfodiesteraza	*toxina Pertussis şi holerică*
III	Gq	α_q	stimulează fosfolipaza C	
IV	G_{13}	α_{13}	stimulează antiportul Na^+-H^+ stimulează fosfolipaza A_2	

Activarea receptorilor determină înlocuirea GDP (guanozin-difosfat), de pe subunitatea alfa, de către GTP. Apoi, prin hidrolizarea de o guanin-trifosfatază, componentă integrală a subunităţii alfa, a GTP, sistemul este inactivat. Subunitatea beta este constantă în aproape toate proteinele G, în timp ce subunitatea alfa conţine o terminaţie de acid miristic, prin care este ancorată în versantul membranar intern.

Dintre familiile de proteine G, exhaustiv studiate sunt doar proteinele G stimulatorii (G_s) sau inhibitorii (G_i) ale adenilat-ciclazei (sintetizează AMPc), răspunsul variind în funcţie de tipul de receptor implicat.

Prin studii de toxicologie, s-au elucidat mecanismele patogenice ale unor toxine şi s-a demonstat interferenţa acestora cu rolul proteinelor G în transducţia intracelulară a semnalului. De exemplu, mecanismul de acţiune al toxinei holerice. Aceasta se leagă de un gangliozid membranar din celulele intestinale şi blochează în conformaţie activă subunitatea alfa a proteinei G; astfel, sinteza de AMPc creşte, iar efluxul de Na^+ şi H_2O în lumenul

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

intenstinal va fi amplificat, producând deshidratare substanţială, cu risc vital.

Alte toxine bacteriene acţionează prin mecanisme similare.

Tabel VII.6.4.4.3. Exemple de căi de transducţie ale semnalului pentru receptori cuplaţi cu proteine G

Receptor	*Stimul*	*Efector*	*Proteina G*	*Răspuns*
β-adrenergic	Adrenalina	Adenilat-ciclaza	G_s	Degradare glicogen Creşterea frecvenţei cardiace
Serotonina	Serotonina	Adenilat-ciclaza	G_s	Excitabilitate neuronală
Glucagon	Glucagon	Adenilat-ciclaza	G_s	Degradare glicogen
Rodopsina	Lumina	Fosfodiesteraza GMPc	Trans-ducină	Stimulare vizuală

Rolurile proteinelor G sunt într-atât de numeroase, încât fac parte din majoritatea receptorilor implicaţi în transducţia semnalului prin mesager secundar. De exemplu, proteinele G participă la turnover-ul fosfoinozitidului, protein-kinaza C fiind activată de acesta, cu mobilizarea Ca^{2+} din depozite, ca şi consecinţă. De asemenea, ele intermediază cuplarea receptorilor, pentru neurotransmiţători, cu canalele ionice, fără a mai fi nevoie de mesageri secundari. Proteina G_0 controlează activitatea canalelor de K^+ şi este abundentă la nivelul creierului.

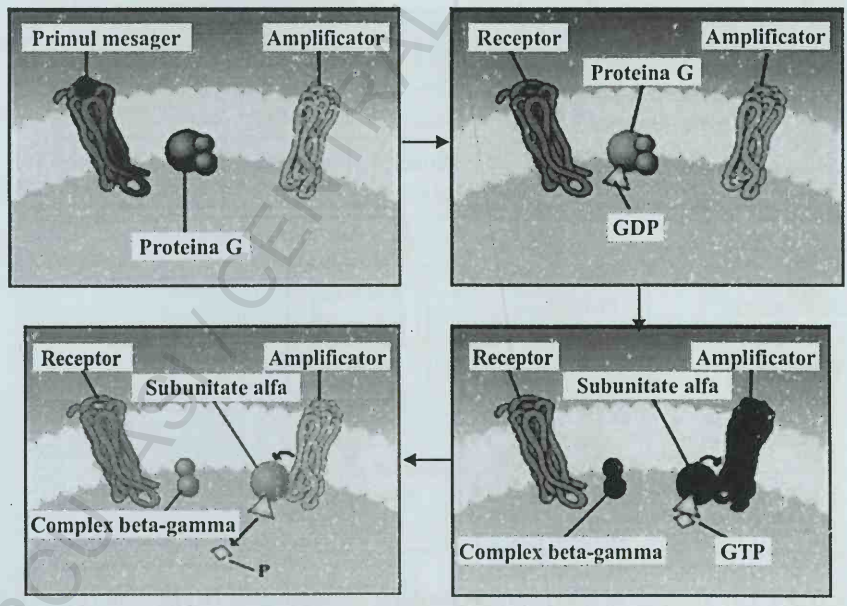


Figura VII.6.4.4.2. Mecanismul receptorilor cuplaţi cu proteina G

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.6.4.5 Receptori cu generare de mesageri secundari

Mesagerul primar, ligandul, este, şi în acest caz, molecula din mediul extracelular prin care receptorul membranar primeşte un mesaj.

Legarea non-covalentă a ligandului la un situs specific, extracelular, al receptorului, modifică conformaţia proteică a receptorului şi declanşează un mecanism de transducţie moleculară, etapizat, prin activarea unor molecule intracelulare, mesagerii secundari. In majoritatea situaţiilor, secvenţa moleculară de transducţie are aproape acelaşi număr de etape. Tipul mecanismului de transducţie depinde de tipul de ligand, astfel fiind posibilă o clasificare a receptorilor membranari pe baza acestui criteriu.

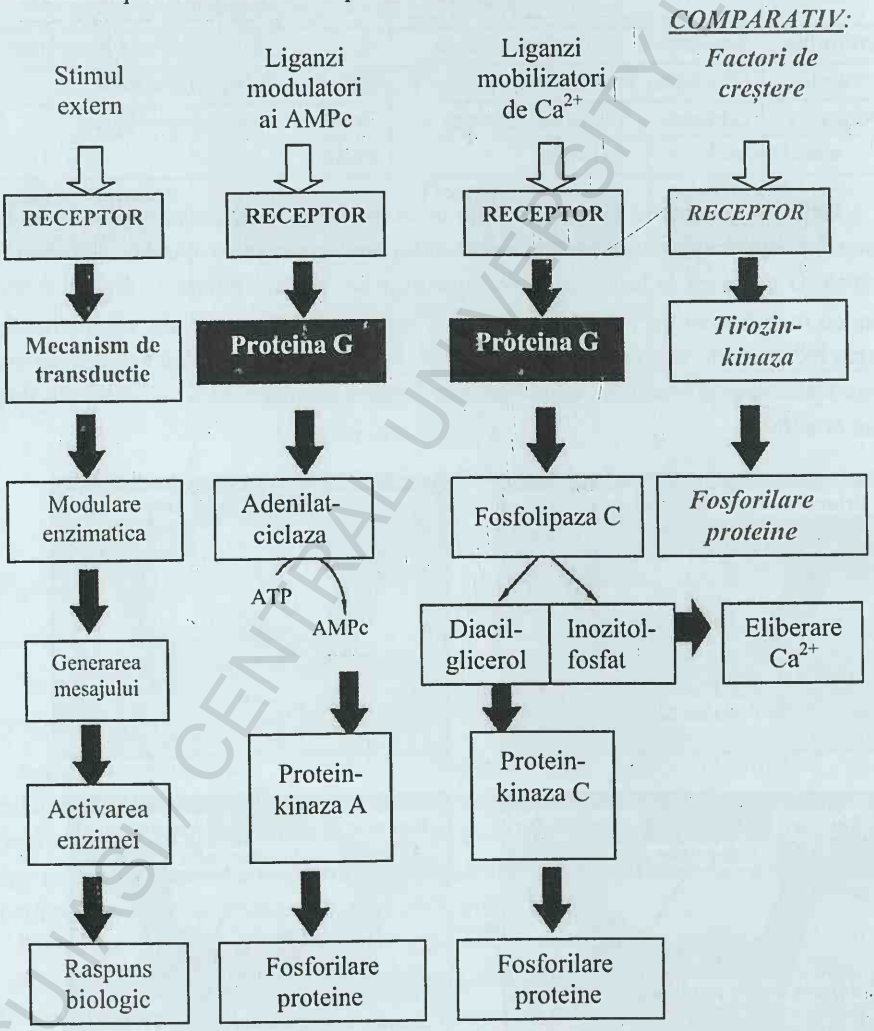


Figura VII.6.4.5.1. Sisteme de mesageri secundari: evenimentele în cascadă la nivelul membranei plasmatice şi în interiorul celulei după activarea unor categorii variate de receptori de către stimuli externi, *cu eliberare de mesageri secunzi sau nu, comparativ (prima coloană – etapele mecanismului)*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

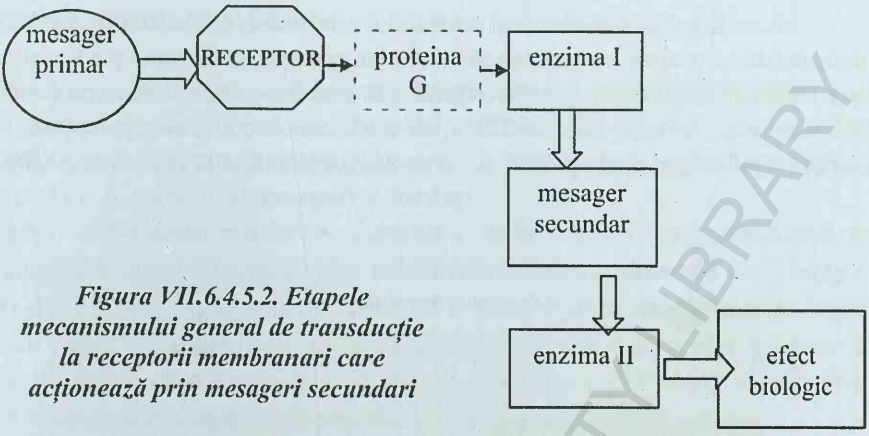


Figura VII.6.4.5.2. Etapele mecanismului general de transducție la receptorii membranari care acționează prin mesageri secundari

Receptorii care acționează prin mesageri secundari pot fi: receptori modulatori ai AMPc sau receptori mobilizatori ai Ca^{2+}, cu producere de DAG (diacil-glicerol) și IP_3 (inozitol trifosfat).

Receptori cu generare de AMPc

Este una dintre cele mai bine studiate categorii de receptori.

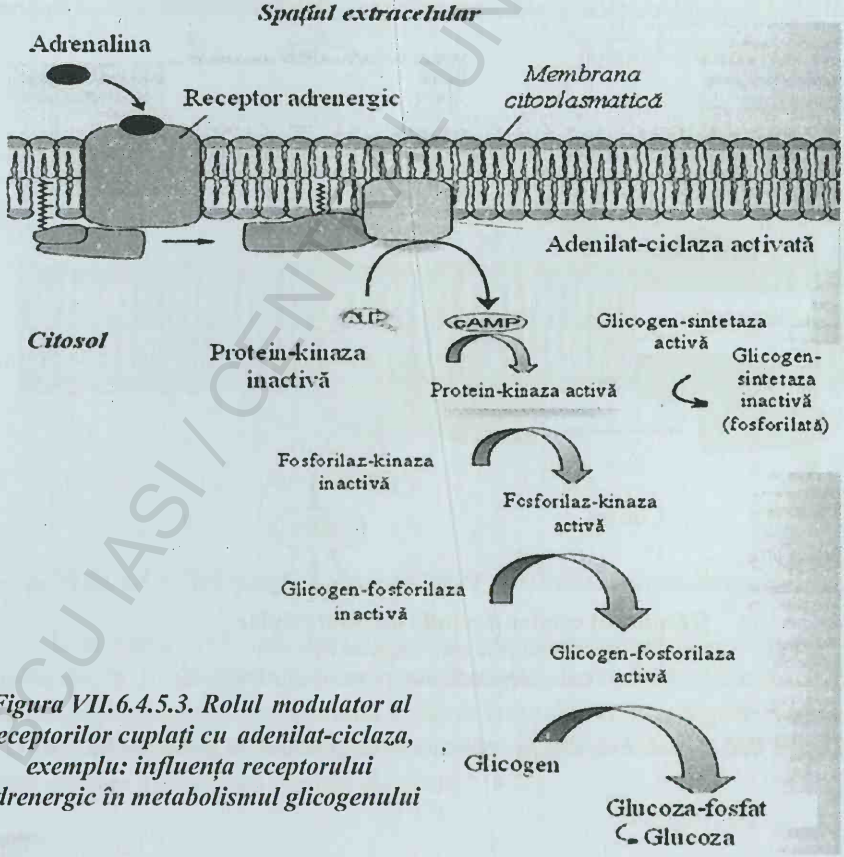
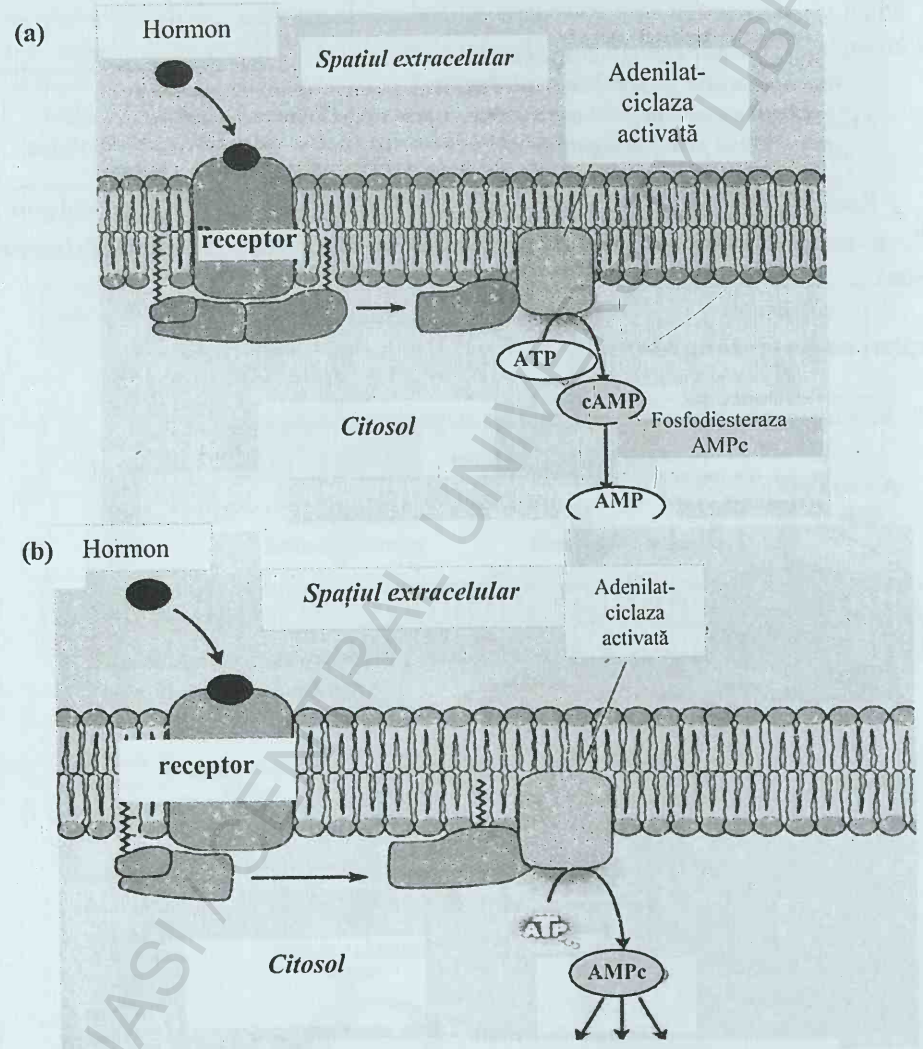


Figura VII.6.4.5.3. Rolul modulator al receptorilor cuplați cu adenilat-ciclaza, exemplu: influența receptorului adrenergic în metabolismul glicogenului

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mecanismul de transducţie al semnalului este uşor de înţeles din figura de mai sus, fiind unul dintre primele mecanisme elucidate. De exemplu, glucagonul şi adrenalina, după ce se leagă de receptorii lor specifici, **stimulează** adenilat-ciclaza pentru a produce AMPc, care, în schimb, fosforilează enzime esenţiale din metabolismul glicogenului (ex. glicogen-sintetaza, fosforilaza) şi al lipolizei. Alt grup de receptori **inhibă** sinteza de AMPc.



Răspunsul celular depinde de tipul celular :
- Nucleu: proteinele care leagă ADN
- Membrana citoplasmatică: proteine canal/receptor

Figura VII.6.4.5.4. Etape în funcţionarea receptorului cu generare de AMPc

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Receptori cu generare de IP_3 şi DAG

O gamă largă de receptori influenţează comportamentul celular prin hidroliza unui fosfolipid minor, fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat (**PIP2**). Fosfolipaza C, specifică fosfoinozitidului, hidrolizează acest fosfolipid pentru a genera inozitol-1,4,5-trifosfat (**IP_3**) şi diacilglicerol (**DAG**), ambii fiind **mesageri secundari**.

Inozitol-1,4,5-trifosfat este hidro-solubil iar după ce este eliberat în citoplasmă, se leagă de situsuri localizate pe membrana intracelulară **a depozitelor de Ca^{2+}**, acestea aparţinând cel mai probabil reticulului endoplasmic. Legarea IP_3 stimulează **efluxul Ca^{2+}** prin canale ionice, modificând astfel activitatea enzimatică, mai ales a enzimelor implicate în inducerea catabolizarii glicogenului hepatic sau activării contracţiilor musculare. În final, toate fosfoinozitidele sunt hidrolizate la **inozitol**.

Diacilglicerolul, celălalt produs de degradare al fosfatilinozitol-4,5-bifosfat, este reţinut în membrana citoplasmatică, unde va activa protein-kinaza C. Esterii de forbol, un grup de substanţe naturale obţinute din ulei de croton, promotori potenţiali ai neoplaziilor tegumentare, se leagă de protein-kinaza C într-o manieră similară diacilglicerolului.

Ulterior, diacilglicerolul este hidrolizat de lipază în acid fosfatidic şi acid arahidonic, acesta din urmă fiind substratul sintezei eicosanoizilor. Familia eicosanoizilor cuprinde prostaglandinele, tromboxanii şi leucotrienele, toţi fiind compuşi cu activitate biologică importantă în reacţiile inflamatorii şi de hipersensibilitate, sintetizaţi majoritar de leucocite.

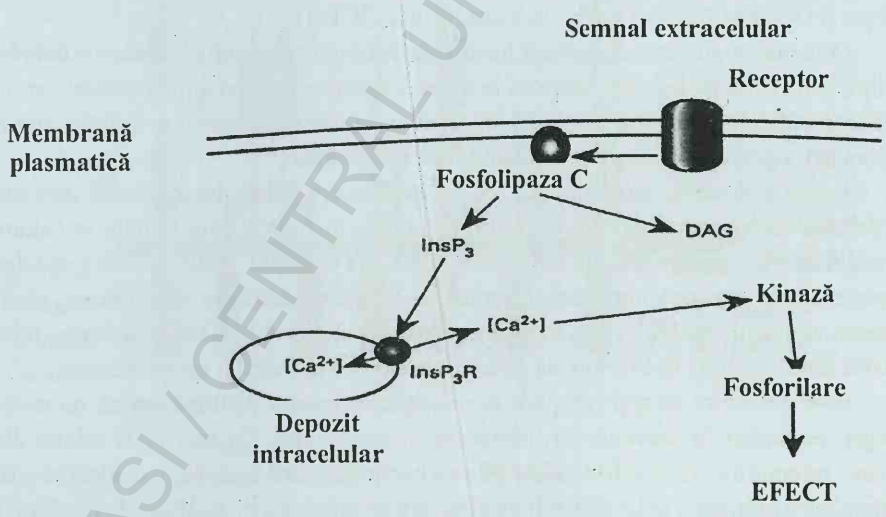


Figura VII.6.4.5.5. Receptori cu generare de IP_3 şi DAG: cascada de evenimente celulare

În prezenţa ATP-ului, diacilglicerolul este catabolizat în acid fosfatidic care este transformat în fosfatidilinozitol, care este fosforilat la fosfatidil-4,5-bifosfat la nivelul membranei citoplasmatice, astfel ciclul fosfatidilinozitolului fiind complet. Proteine asociate cu GTP sunt implicate în transmiterea semnalului produs de interacţiunea ligand-receptor, natura acestora nefiind încă complet elucidată.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VII.6.4.6. Receptori cu activitate protein-kinazică intrinsecă

Aceştia reprezintă o clasă de receptori cunoscuţi şi sub numele de *receptori-enzime.* Exemplele tipice din această clasă sunt: receptorul pentru insulină, receptorul EGF (factorul de creştere epidermică) şi receptorul ANF.

Receptorul pentru insulină

Majoritatea celulelor eucariote prezintă receptori pentru insulină, numărul lor variind de la 100 la 100000 per celulă. Receptorul pentru insulină este o glicoproteină transmembranară alcătuită din aproximativ 1370-1382 aminoacizi, formată din 2 subunităţi alfa (130 kDa) şi 2 subunităţi beta (95 kDa) conectate prin punţi disulfidice. Imediat după cuplarea moleculei de insulină la receptorul de pe membrana citoplasmatică, receptorul se autofosforilează. După câteva minute, complexul receptor-insulină este internalizat, iar consecinţele metabolice pe termen scurt se manifestă în transportul glucozei, aminoacizilor şi ionilor; pe termen lung consecinţele sunt asupra metabolismului celular şi a creşterii celulare.

Autofosforilarea resturilor de tirozină are loc în domeniul citoplasmatic al subunităţii beta prin tirozin-fosfokinaza intrinsecă receptorului. Autofosforilarea este o proprietate a anumitor clase de receptori şi a fost demonstrată la nivelul unor receptori ai factorilor de creştere, printre care factorul de creştere epidermică (EGF), factorul de creştere derivat din plachete (PDGF), şi factorul de creştere insulin-like (IGF-1).

Cele mai importante domenii şi funcţii ale diferitelor domenii ale receptorului pentru insulină, sunt: rolul de legare a insulinei la nivelul situsului din domeniul extracelular, rolul punţilor disulfidice de legare intercatenară, domeniul transmembranar – tipic receptorilor membranari, cel tirozin-kinazic şi domeniul intracitoplasmatic.

Pentru a descifra, experimental, ce rol are fiecare dintre domeniile de mai sus în funcţionarea receptorului, receptorul pentru insulină a fost supus unor mutaţii în culturi de celule din care au rezultat diferite forme trunchiate. De exemplu, înlăturarea domeniului cu activitate tirozin-kinazică intrinsecă, responsabil de autofosforilarea receptorului, produce pierderea activităţii biologice iar endocitoza receptorului este blocată, activitatea tirozin-kinazică fiind esenţială în exprimarea efectelor biologice ale acestui tip de receptor.

Spre deosebire de alţi receptori hormonali, receptorul pentru insulină nu necesită mesageri secundari în secvenţa de transducţie a semnalului. Cu privire la relaţia dintre activarea receptorului de insulină şi fosforilarea enzimelor-ţintă studiile au evidenţiat efectul de stimulare a hidrolizei unui fosfatidilinozitol-glican prin legarea insulinei de receptor. Cei 2 produşi de reacţie, inozitol fosfoglican şi diacilglicerol, reglează selectiv protein-kinazele şi fosfodiesterazele.

Mecanismul prin care insulina stimulează transportul intracelular al glucozei presupune accelerarea traficului membranar al transportorilor de glucoză, prin mobilizarea acestora din veziculele intracelulare. Transportorul de glucoză al adipocitelor este o proteină membranară de 42 kDa, iar pe modele de transport al glucozei în celule eucariote şi procariote, molecula transportoare traversează bistratul lipidic de 12 ori, capetele amino- şi carboxi-terminale fiind situate pe versantul citoplasmatic.

BCU - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Receptorii factorilor de creştere

Receptorii factorilor de creştere încorporează, de asemenea, în structura lor o proteină cu activitate tirozin-kinazică intrinsecă. Până în acest moment au fost caracterizaţi peste 20 de factori de creştere care stimulează proliferarea şi diferenţierea celulară. Cel mai bine studiat este receptorul factorului de creştere epidermică (EGF).

Structura receptorului EGF constă dintr-un singur polipeptid de 1186 aminoacizi. Domeniul extracelular, din 621 aminoacizi, are 2 caracteristici structurale distincte - bogat în cisteină, cu prezenţa a până la 25 punţi disulfidice, receptorul fiind astfel foarte rezistent la proteoliză, şi prezenţa de carbohidraţi legaţi de grupările funcţionale amino-. Domeniul citoplasmatic conţine situsul de activitate tirozin-fosfokinazică. O caracteristică interesantă a structurii receptorului, comună şi altor receptori ai factorilor de creştere, este prezenţa unei secvenţe formate din 13 resturi de aminoacizi bazici. Această regiune bazică se pare că ar avea rolul unei secvenţe "stop transfer", imediat după inserţia capătului amino-terminal în reticulul endoplasmic, în procesul de biosinteză.

Secvenţele de aminoacizi încărcaţi electric corepund caracteristicilor generale ale regiunilor citoplasmice din structura proteinelor transmembranare. Date experimentale sugerează absenţa reciclării receptorului EGF între compartimentul endocitar şi cel membranar, acesta fiind transferat, în schimb, în lizozomi şi degradat aici.

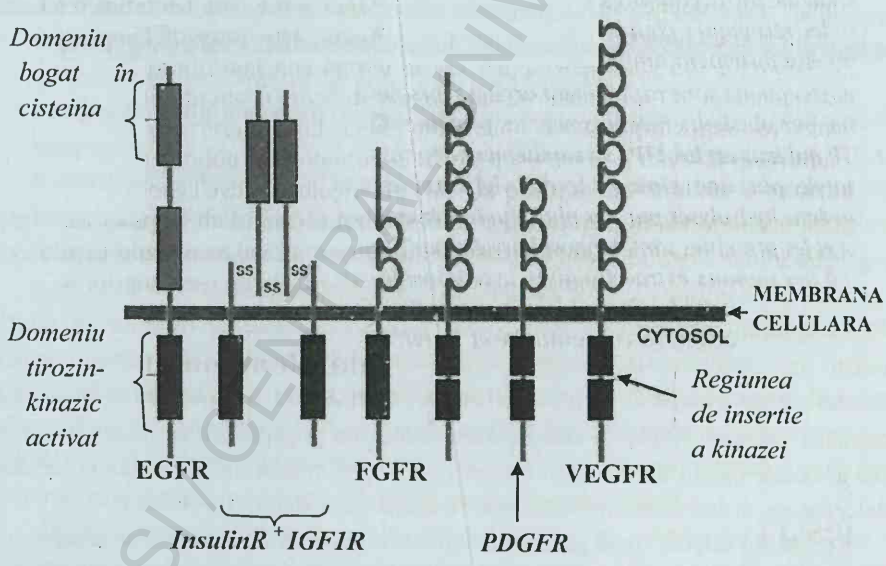


Figura VII.6.4.6.1. Familia receptorilor factorilor de creştere

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITARĂ

Enzimele protein-kinazice

Protein-kinazele sunt o clasă de enzime prezente în toate celulele eucariote şi implicate în semnalizarea intracelulară prin fosforilare ireversibilă a substraturilor, majoritatea dintre acestea fiind ancorate în membrane. Au fost identificate cel puţin 3 categorii majore de kinaze, şi anume kinaza dependentă de nucleotide ciclice, kinaza activată de complexul Ca^{2+}/calmodulină şi protein-kinaza C. Toate au similtudini în secvenţa de aminoacizi a situsului catalitic. Totuşi, diferenţe minore există între structura claselor de protein-kinaze care fosforilează în dreptul resturilor de treonină/serină şi cele care fosforilează doar în dreptul resturilor de tirozină.

Majoritatea - dar nu toate - protein-kinazelor cu activitate tirozin-kinazică au funcţie de receptor pentru transducţia semnalului furnizat de hormoni peptidici circulanţi sau factori de creştere. De exemplu, după cum s-a discutat mai sus, receptorii factorilor de creştere şi cel al insulinei exprimă activitate tirozin-kinazică care este determinantă în rolul lor biologic de transmitere intracelulară a informaţiei.

Kinazele sunt, în general, enzime formate din mai multe subunităţi, unele cu activitate catalitică, iar altele cu activitate reglatoare. Fosforilarea unor resturi de aminoacizi, ca de exemplu tirozina, induce modificări conformaţionale în topografia constituentului membranar, care poate influenţa pozitiv sau negativ parametrii de transmitere intracelulară a semnalului. Protein-kinazele acţionează într-o manieră coordonată cu fosfatazele membranare, care vor defosforila proteinele, formându-se astfel circuite de reglare.

VII.6.4.7. Receptori asociaţi canalelor ionice

Membrana citoplasmatică menţine şi controlează gradientele ionice între spaţiul intra- şi extracelular. Pentru a îndeplini această funcţie sunt necesare pompe şi canale ionice care ar putea fi ele în sine receptori sau indirect reglate de receptori.

Receptorul colinergic de tip nicotinic este un exemplu de receptor cu multiple subunităţi în structura sa. Legarea ligandului, acetilcolină, la situsul specific agonistului de pe receptor va produce deschiderea directă a canalului pentru câteva milisecunde. Influxul de Na^+ în sinapsă va declanşa un potenţial de acţiune. În schimb, legarea aceluiaşi ligand de receptorul colinergic de tip muscarinic va afecta conductanţa canalelor ionice, având ca intermediar, în transducţia semnalului, o proteină G.

Receptorul GABA (acid gamma-aminobutiric) este un alt exemplu de receptor care reglează în mod direct fluxul de ioni în transmisia sinaptică. Structura receptorului are o conformaţie spaţială care permite pasajul ionilor de Cl^-, ridicând astfel potenţialul de repaus membranar (hiperpolarizare). Celula va fi mai refractară la stimuli, ceea ce explică rolul de neurotransmiţător inhibitor al GABA. Hipnoticele sedative (ex.benzodiazepinele) se leagă alosteric la acest receptor şi potenţează efectele GABA, astfel crescând permeabilitatea membranara pentru ionii Cl^-.

Receptorii asociaţi canalelor ionice prezintă, în esenţă, următoarele particularităţi:

- sunt proteine mari sau ansambluri de subunităţi care traversează de mai multe ori membrana plasmatică ;

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- domeniul extracelular include situsul de cuplare cu ligandul (de obicei un neurotransmiţător) ;
- domeniul transmembranar include un canal ionic.

VII.6.4.8. Receptori de internalizare a ligandului

Această familie aparţine receptorilor membranari care asigură transportul transmembranar al ligandului. Aceşti receptori nu transmit informaţii, ci doar *aprovizionează celula cu unele molecule*. Exemplele tipice sunt receptorii din metabolismul fierului şi al lipoproteinelor.

Receptorul pentru lipoproteine cu densitate mică (LDL)

Colesterolul este transportat în ser din ficat către ţesuturile periferice sub formă de esteri de colesterol încorporaţi în lipoproteine cu densitate mică (LDL). LDL este colectat de celulele periferice prin endocitoză. Receptorul LDL de pe suprafaţa acestor celule recunoaşte apoproteine specifice de pe suprafaţa moleculei de LDL.

Receptorul LDL este o glicoproteină membranară, integrală, de 160 kDa, formată din 5 domenii (exceptând secvenţa semnal amino-terminală). Cele 5 domenii, în ordinea dinspre versantul extracelular către cel citoplasmatic, sunt:

- secvenţa de legare a LDL, alcătuită din 300 de aminoacizi (are omologie structurală cu componentele C8 şi C9 ale sistemului complement);
- o secvenţă de 400 aminoacizi omoloagă cu precursorul pentru EGF, cu rol în reciclarea receptorului;
- o secvenţă de 58 aminoacizi bogată în resturi de serină şi treonina, de care sunt ataşate lanţuri glicozidice prin gruparea funcţională -OH, care ar putea avea un rol în plasarea receptorului în topografia corectă a membranei celulare;
- o secvenţă transmembranară de 22-25 aminoacizi;
- şi o secvenţă citoplasmatică de 50 de aminoacizi care probabil direcţionează receptorul către zonele supraspecializate din membrana citoplasmatică.

După ce receptorul şi molecula de LDL disociază, receptorul se întoarce la suprafaţa celulei, în timp ce molecula de LDL este transferată în lizozomi unde colesterolul esterificat va fi hidrolizat şi eliberat. Concentraţia intracelulară de colesterol controlează nu doar sinteza sa *de novo*, ci şi exprimarea receptorilor LDL pe membrana celulară.

În hipercolesterolemia familială, nivelul ridicat al colesterolului din ser este consecinţa unui defect în funcţionalitatea receptorilor pentru LDL, amplificat de sinteză *de novo* intracelulară a colesterolului. Apariţia unor mutaţii genetice care vor influenţa structura şi funcţia receptorilor LDL este o caracteristică tipică acestei boli. Au fost identificate 4 tipuri de mutaţii, care au repercusiuni în: sinteza receptorului LDL, transportul acestuia la suprafaţa membranei celulare, capacitatea de legare a LDL şi asocierea receptorului în veziculele intracelulare.

Aceste modificări induse de mutaţiile genetice au fost utile în definirea importanţei funcţionale a domeniilor receptorului.

BABEŞ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

VII.6.5. Receptori intracelulari

Toți liganzii care sunt molecule lipofile mici (cum sunt hormonii steroizi, vitamina A, D, hormonii tiroidieni etc.) pot traversa liber membrana plasmatică, deci nu au nevoie de un receptor membranar, dar, pentru a-și exercita acțiunea, vor trebui să se cupleze cu un receptor specific, care se va găsi intracelular.

Receptorii intracelulari sunt receptori factori de transcripție; au o structură tipică, foarte bine conservată în evoluție, cu o mare similaritate între receptori. Aceștia conțin aproximativ 400 - 800 reziduuri amino și două regiuni cu o importanță deosebită, numite *degete de zinc*. Pot fi identificate trei domenii:

- **Doomeniul A:** Domeniul terminal COOH, conține situsul de legare pentru ligandul specific, are un rol în dimerizarea receptorului și leagă o proteină inhibitoare, *hsp90*.
- **Domeniul B:** Această regiune are multe resturi de cisteină care sunt legate coordinativ cu un atom de zinc (patru resturi de cisteină pentru un atom Zn), menținând o conformație specifică numită *deget de zinc* (există două degete de zinc pentru fiecare receptor), importantă pentru legarea la ADN. Degetul de zinc din partea N-terminală este în contact cu un anume domeniu AND, numit HRE (Hormone Response Elements). Degetul de zinc de pe partea COOH stabilizează legarea, interacționând cu reziduurile oze-fosfatice ale ADN-ului. Acest domeniu pare a fi determinant pentru efectul final al receptorului.

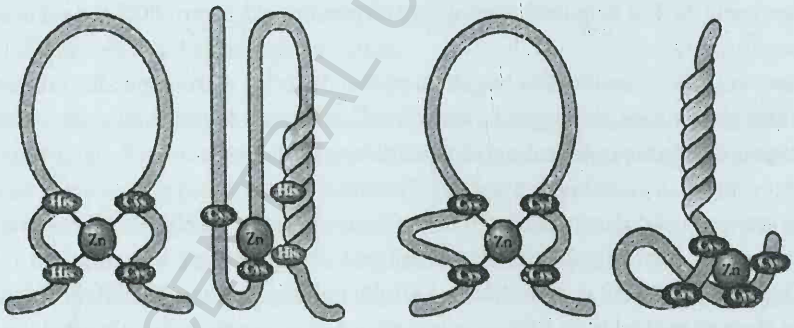


Figura VII.6.5.1. Degetul de zinc (107)

- **Domeniul C**: domeniul terminal NH_2 nu are încă o funcție bine definită și este partea cea mai variabilă între diferitele tipuri de receptori nucleari.

Mecanismul de activare a receptorilor

Acest mecanism constă, în general, în legarea complexului ligand-receptor la secvențe bine definite ale ADN-ului, determinând fie suprimarea, fie stimularea exprimării unor gene.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

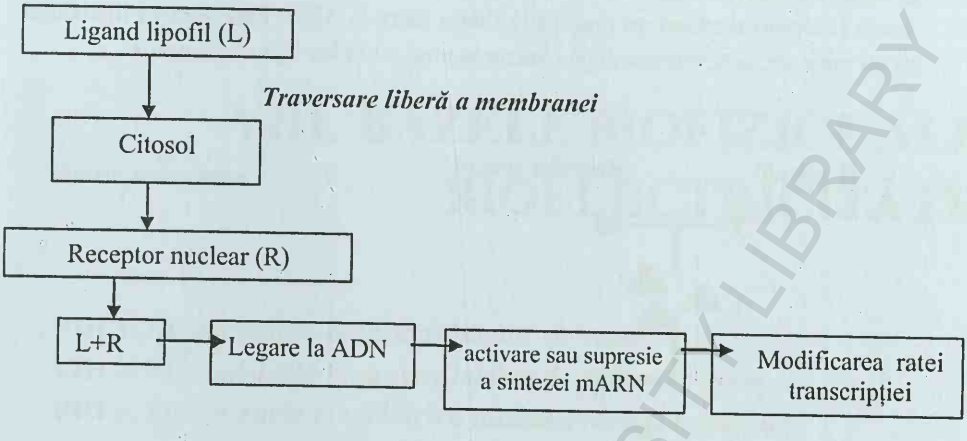


Figura VII.6.5.2. Mecanismul activării receptorilor intracelulari

Două mecanisme** pot fi implicate în **traducerea semnalului:

1) În cazul liganzilor steroizi și a dioxinei, receptorii sunt asociați cu o proteină inhibitoare, *hsp* (heat shock protein) cu o masă moleculară de 90 kDa (*hsp90*). Legarea ligandului la receptor determină activarea receptorului, determinată prin disocierea acestei protein *hsp* și apoi prin fosforilare. Receptorul activat se va lega la ADN ca dimer.

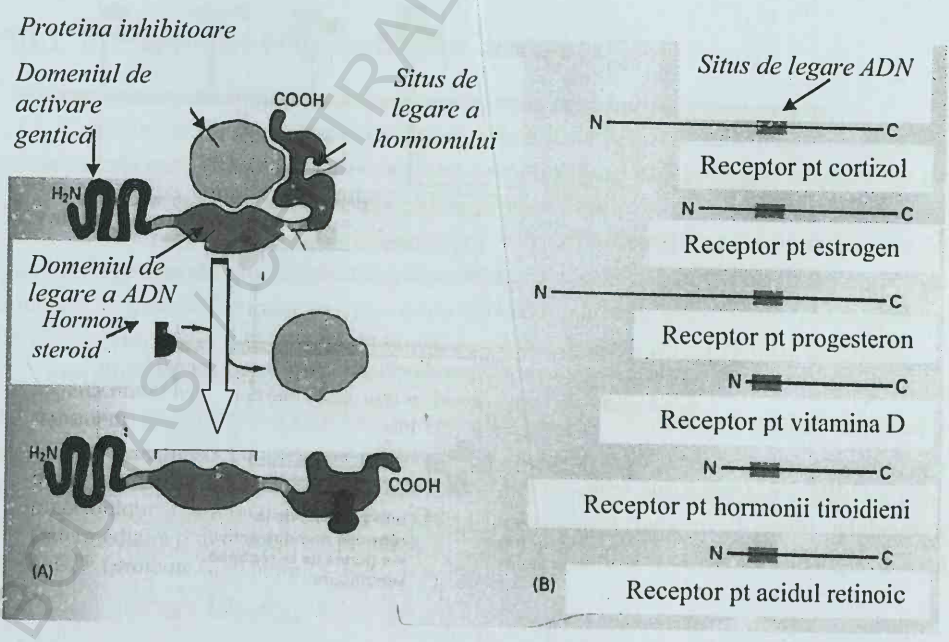


Figura VII.6.5.3. Receptori intracelulari: A) mecanismul de activare a receptorului hormonilor steroizi; B) prezentare schematică a unor receptori intracelulari (66)

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2) În cazul retinoizilor sau hormonilor tiroidieni nu există o proteină inhibitoare *hsp*. Acești receptori nucleari au o afinitate foarte mare la ADN. Fără legarea ligandului au rol represor, care dispare după realizarea unui complex ligand- receptor.

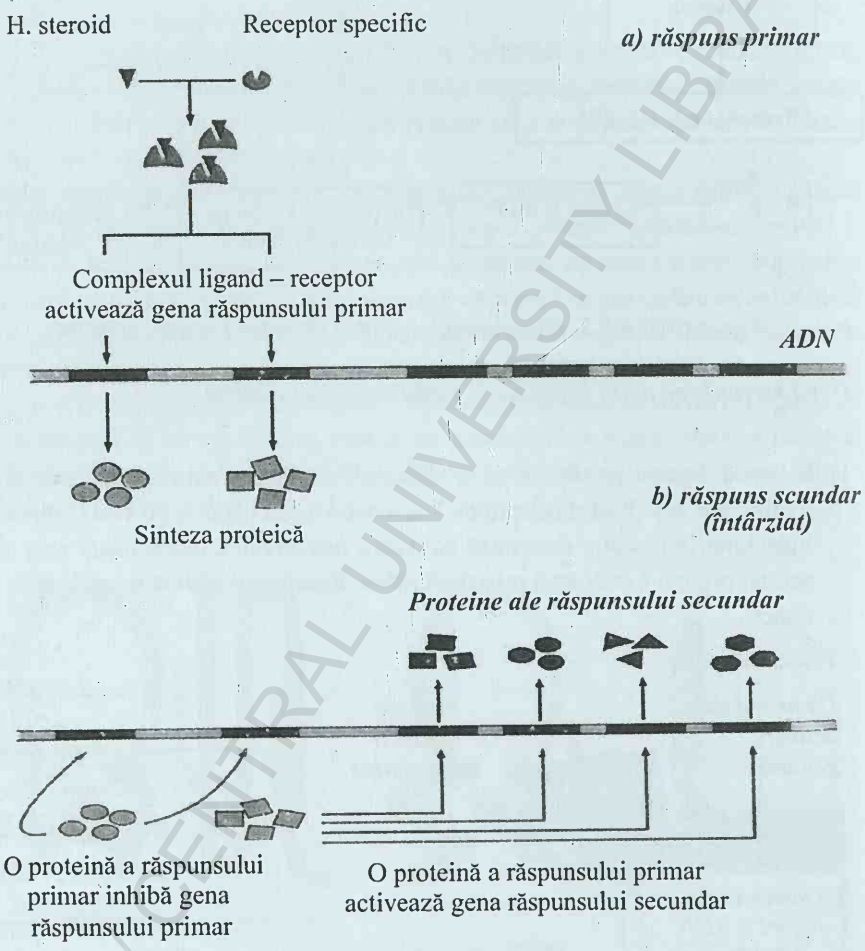


Figura VII.6.5.4. Răspuns primar, imediat (a) și secundar, întârziat (b) după activarea receptorilor nucleari (103)

Odată ce receptorul este activat, răspunsul de activare al receptorului intracelular poate fi imediat (primar) sau întârziat (fie prin inhibarea, fie prin activarea genelor de răspuns primar), după cum se observă și din figura de mai sus.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

VIII. BAZELE BIOFIZICE ALE BIOELECTRICITĂȚII

VIII.1. Mecanismele biopotențialelor de repaus
VIII.2. Mecanismele biopotențialelor de acțiune
VIII.3. Fenomenele bioelectrice musculare

Concepția conform căreia celulele și țesuturile pot genera curenți electrici mici este cunoscută de mult. Totalitatea fenomenelor electrice din țesuturile vii sunt reunite sub numele de *bioelectricitate*, *Luigi Galvani*, "părintele bioelectricității" fiind primul care a studiat acest fenomen, așa cum s-a prezentat și în cursul introductiv.

VIII.1. Mecanismele biopotențialelor de repaus

Celulele vii se caracterizează printr-o diferență de potențial electric între cele două fețe ale membranei, care se menține în situatia de repaus, numită ***potențial membranar de repaus.*** Această mică diferență de potențial, de aproximativ *(-70) pâna la (–90)mV,* este determinată de o asimetrie de distribuție ionică între interiorul și exteriorul membranei, în repaus. Atât pentru structuri excitabile cât și pentru cele inexcitabile, potențialul membranar de repaus se modifică în răspuns la o serie de modificări ale unor factori fizico-chimici diferiți, ex. temperatură, pH, concentrații extracelulare de ioni, curent electric extrinsec.

Profilul caracteristic al gradienților de ioni de-a lungul membranei plasmatice în condițiile stării de echilibru a celulelor vii este: concentrația citoplasmatică a Na^+ este relativ scazută, iar concentrația citoplasmatică a K^+ este relativ crescută, comparativ cu concentrațiile extracelulare ale acestor ioni. Această condiție specifică este menținută prin acțiunea Na^+-K^+-ATP-azei, care consumă peste 25% din metabolismul energetic bazal al unei celule tipice.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabel VIII.1.1 Distribuția intra și extracelulară a ionilor în repaus

Ioni	*Extracelular (mEq/L)*	*Intracelular (mEq/L)*
Na^+	**140**	**10**
Cl^-	**103**	**4**
HCO^{3-}	28	10
Ca^{++}	**5**	**0**
Glucoza	90	10
Sulfați	1	2
Lipide	0,5	3
Mg^{++}	3	62
Fosfați	4	75
K^+	**5**	**141**
Aminoacizi	30	200

Mecanismul de generare al potențialului membranei

Membranele biologice nu prezintă aceeași permeabilitate pentru toate tipurile de ioni; se poate spune că fiecare tip de membrană celulară prezintă o anumită permeabilitate pentru fiecare dintre ionii anorganici majori din fluidele organismului. Pentru majoritatea celulelor, singurii ioni care pot exercita o influență semnificativă asupra fenomenelor bioelectrice sunt "cei trei mari" (în privința concentrației): *K^+, Na^+ și Cl^- (și Ca^{2+} este de asemenea foarte important în câteva tipuri tisulare).*

Pentru a explica echilibrul ionic în starea de repaus corespunzătoare unei distribuții asimetrice a ionilor de o parte și de alta a membranei plasmatice, s-au dezvoltat o serie de ecuații, pornind de la ***ecuatia Nernst*** care permite calculul potențialului electric de echilibru pentru un ion (K^+):

$$V_K = -\frac{RT}{zF} ln \frac{[K]_{in}}{[K]_{ex}}$$

unde : - V_K este diferența de potențial electric de echilibru (DP),
- [K]in, [K]ex sunt concentrațiile de K^+ în interior, respectiv exterior,
- R, și F - constante; T - temperatura absolută,
- z este valența ionului indicat ($^+1$ pentru K^+)

Daca introducem valorile corespunzătoare pentru R, T, F, și z, si convertim din logaritm natural în logaritm în baza 10 (adică, înmulțim cu 2,303), *ecuația Nernst* devine:

$$V_K \approx -60mV \; log_{10} \frac{[K]_{in}}{[K]_{ex}}$$

Pentru a explica echilibrul membranar ionic real, *ecuația Nernst* trebuie modificată. Noua ecuație este numită ***Goldman-Hodgkin-Katz*** sau simplificat ***'ecuația Goldman'***:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$V_m \approx -60mV\ log_{10} \frac{P_K[K]_{in} + P_{Na}[Na]_{in} + P_{Cl}[Cl]_{ex}}{P_K[K]_{ex} + P_{Na}[Na]_{ex} + P_{Cl}[Cl]_{in}}$$

unde:

Vm este DP actual membranar și Pi este permeabilitatea membranei (în cm/sec) pentru ionul indicat (Na^+, K^+ și Cl^-), în interior (in) și în exterior (ex)

Aceasta înseamnă, de fapt, că permeabilitatea selectivă a membranei plasmatice care influențează în principal potențialul membranar de repaus este permeabilitatea pentru Na^+, K^+ și Cl^-. Deși, în condiții fiziologice, normale, termenii privind concentrația din *ecuația* ***Goldman*** rămân relativ constanți, termenii privind permeabilitatea nu rămân. Intr-adevar, schimbările mari, rapide în permeabilitatea pentru diferiți ioni reprezintă baza pentru controlul fenomenelor bioelectrice. La nivel molecular, permeabilitatea membranei pentru ioni este definită mai ales prin activitatea canalelor ionice membranare.

În repaus, cea mai mare permeabilitate membranară, pentru aproape toate celulele, este pentru K^+. Baza pentru această permeabilitate de repaus constă într-o populație de **canale** K^+care nu sunt voltaj dependente. Combinația unui gradient K^+ îndreptat spre exterior (rezultatul activitatii Na^+-K^+ ATP-azei) și o permeabilitate ridicată pentru K^+ face ca interiorul celulelor animale să fie electric negativ în raport cu mediul extern. Totuși, permeabilitatea mmembranară pentru Na^+și Cl^- face imposibilă atingerea potențialului Nernst dependent doar de K^+.

VIII.2. Mecanismele biopotențialelor de acțiune

Anumite celule din organismele vii (celule nervoase, celule receptoare senzoriale la animale și de asemenea unele celule vegetale) sunt denumite **excitabile electric**, deoarece atunci când un curent electric, cu o anumită intensitate, este trecut prin membrana celulară a acestui tip de celule, este generată o schimbare în potențialul membranei, numită *potențial de acțiune*. Acest lucru ar putea fi înțeles ca o energie stocată a celulei eliberată într-o perioadă scurtă de timp; potențialul interior al celulei se ridică rapid de la aproximativ (–90) mV la aproximativ (+20) – (+30) mV. Acest proces se numește **depolarizare**, fiind strâns legat de creșterea influxului de ioni de sodiu în celulă; membrana își crește permeabilitatea pentru sodiu, în special prin deschiderea canalelor de sodiu.

Atât forța electrică cât și/sau gradientul de concentrație au tendința de a face sistemul instabil cu privire la pasajul ionilor de sodiu spre interior; odată ce începe influxul, este auto-susținut până când este contracarat de o altă migrare de tip ionic, ionii de potasiu care controlează un al doilea proces, ***repolarizarea***. Potențialul interior se ridică înapoi, la –90 mV (***potentialul de repaus***). Acest impuls de tensiune produs de procesele depolarizare – repolarizare reprezintă ***potențialul de acțiune***.

Pentru diferite tipuri celulare, potențialul de acțiune poate *diferi în formă*. In orice caz, potențialul de acțiune are o amplitudine care este invariabil de aproximativ 100 mV, această amplitudine fiind explicată de potențialul de echilibru Nernst al ionilor permeanți.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Spre deosebire de gama mică de amplitudini ale potențialului de acțiune, durata de acțiune a potențialului de acțiune variază foarte mult cu tipul de celulă: mai puțin de 1 ms în anumiți neuroni, aproximativ 10 ms în fibrele musculare scheletice, 0,5 s în fibrele musculare cardiace ... până la câteva secunde în anumite celule de plante excitabile electric. Durata potențialului de acțiune depinde și foarte mult de temperatură.

Prag

Există o anumită valoare minimală necesară pentru a obține un potențial de acțiune ca răspuns la un scurt impuls de curent; această valoare este foarte precisă: o variație de doar 0,1% în minus poate reprezenta deja un curent nesemnificativ. Potențialul de acțiune se spune ca este un *potențial totul-sau-nimic*.

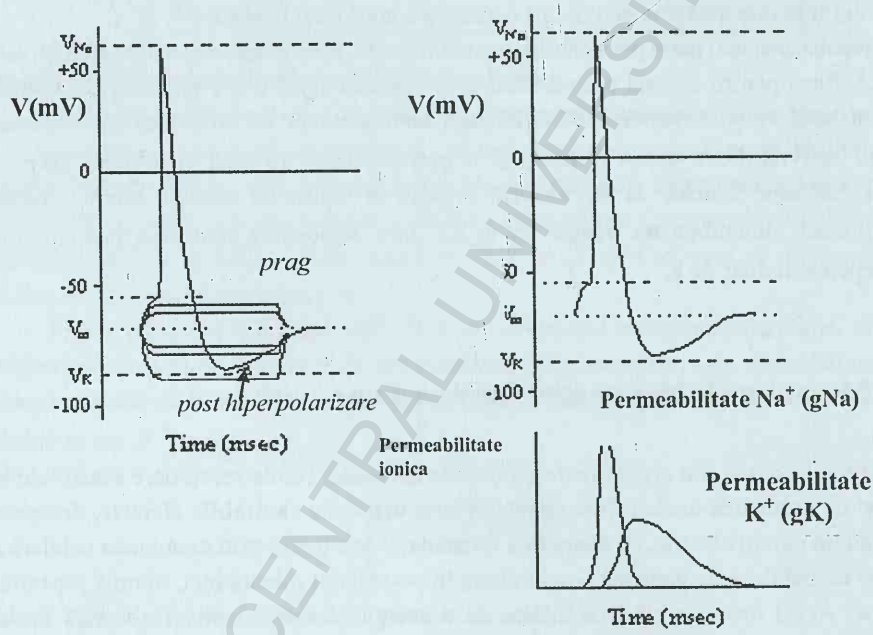


Figura VIII.2.1. Potențialul de acțiune, cu indicarea etapelor sale principale și modificările asociate permeabilității membranei (conductivitatea) la Na^+ și K^+ (1)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Perioadă refractară

După un potențial de acțiune, un al doilea potențial de acțiune poate apărea numai după un interval de timp minim, în care celula se consideră a fi *refractară*. Aceste proprietăți refractare indică faptul că mecanismul care generează potențialul de acțiune necesită un timp pentru recuperarea din efectele producerii unui potențial de acțiune. Perioadele refractare absolute sunt de ordinul câtorva milisecunde în axonii nevertebratelor mari, însă această perioadă refractară poate dura până la câteva minute, în anumite situații.

În cazul celulelor mari sau în celule cu membrane celulare mari, cum sunt celulele nervoase cu prelungiri lungi (axoni), potențialul de acțiune este generat într-o parte a membranei și transmis în alte părți, procesul de conducere electrică fiind destul de diferit de conducerea curenților electrici în conductori metalici, de asemeni și viteza: conducerea electronului în conductori metalici determină curenți care se deplasează cu viteză aproximativ egală cu viteza luminii, în timp ce conducerea potențialului de acțiune determină impulsuri de-a lungul nervilor ce se transmit cu *o viteză care variază de la aproximativ 1 la 100 de metri/sec.* Impulsurile se deplasează cel mai rapid în neuronii mari, de exemplu impulsurile din coloana vertebrală, viteza fiind redusă cu un factor de 100 în cele mai mici fibre nervoase.

Propagarea impulsurilor (potențiale de acțiune) de către fibrele nervoase și alte celule produce tensiuni electrice măsurabile în toate punctele corpului, ceea ce oferă baza multor măsurători bioelectrice, cum ar fi ECG și EEG.

Să analizăm în detaliu fenomenele din spatele acestui eveniment depolarizant numit *potențial de acțiune*. Acesta a fost inițiat când diferența de potențial (DP) a atins un anumit nivel denumit *potențial de prag* membranar, iar stimulul care determină modificarea DP la acest nivel se numește *stimul de prag*. Cand potențialul atinge această valoare, încep să se deschidă o serie *de canale* Na^+, crescând astfel PNa^+ a membranei; membrana se va depolariza. Această depolarizare, la rândul său, servește la deschiderea mai multor canale de Na^+, care conduc la o depolarizare ulterioară a membranei, cu o creștere masivă a PNa^+, un proces denumit *ciclu Hodgkin*. În axonul gigantic de calamar, de exemplu, creșterea PNa^+ este de 4000 de ori.

Repolarizarea rapidă a membranei provine din două fenomene. Primul fenomen este închiderea canalelor de Na^+. După deschidere, aceste canale Na^+ se închid spontan, indiferent dacă stimulul original este activ sau nu, ca urmare a modificărilor apărute în potențialul membranar.

Al doilea fenomen presupune o creștere a PK^+. Există o populație *de canale de K voltaj dependente* în membrană care, ca și canalele Na^+, sunt deschise prin depolarizarea membranei, deși necesită un grad mai mare de depolarizare (altă diferență de potențial ca trigger) decât canalele de Na^+. Cinetica activării canalelor de K^+ este de astfel încât acestea necesită mai mult timp decât deschiderea canalelor de Na^+, deci întârzierea creșterii PK^+. După închiderea rapidă a canalelor de Na^+, permeabilitatea membranei este dominată, încă o dată, de K^+, astfel că potențialul membranei este adus înapoi spre DP de repaus. Cu toate acestea, deschiderea canalelor de K^+ voltaj dependente, care

există în plus față canalele de K^+ care nu sunt voltaj-dependente, are ca rezultat un PK global care depășește starea de repaus.

Prin urmare, potențialul membranei scade sub nivelul de repaus și se apropie de potențialul de echilibru Nernst pentru K^+.

După repolarizare, canalele K^+ voltaj dependente se închid, astfel încât PK^+ revine la nivelul de repaus, ca și DP. O hiperpolarizare tranzitorie rezultă din activitatea sumată a canalelor de K^+, dependente sau nu de voltaj, numite "***post hiperpolarizare***".

Mecanismul potențialului de acțiune poate fi în relație cu unele disfuncții :

Prima implică întârzierea închiderii canalelor de Na^+ care este baza acțiunii mai multor toxine de scorpion. O alta presupune blocarea canalelor de K^+, care este baza acțiunii pentru unele toxine marine de anemone.

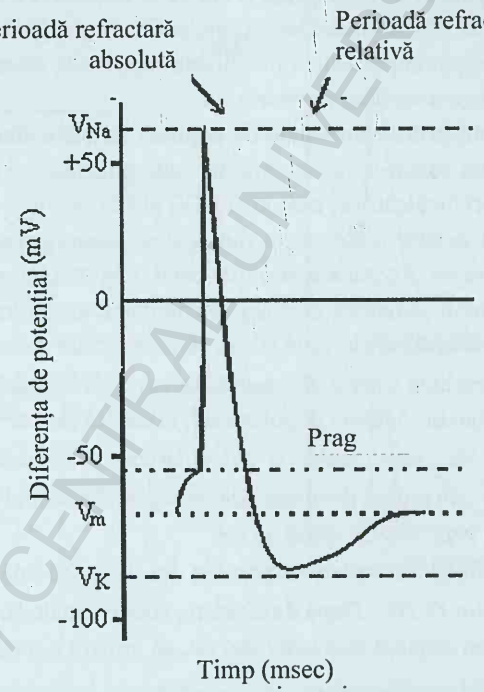


Figura VIII.2.2. Reprezentarea grafică a perioadelor refractare, absolută și relativă, a unui potențial de acțiune (1)

Caracterul *totul-sau-nimic* al potențialului de acțiune poate fi explicat, de asemenea, după cum urmează: închiderea spontană a canalelor de Na^+ urmează unei perioade de timp în care un al doilea potențial de acțiune nu poate fi generat indiferent cât de mare este stimulul. Această perioadă de timp este perioada *refractară absolută.* Apoi urmează o perioadă de timp în care este posibil să se obțină un potențial de acțiune,

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

dar necesită un stimul mai mare decât normal. Aceasta este perioada *refractară relativă.*

Odată ce membrana a fost repolarizată peste un anumit nivel (specific pentru fiecare tip de celulă / tip de canal), canalele de Na^+ încep să treacă într-o a doua stare inactivă, adică una care poate fi stimulată printr-o depolarizare ulterioară. Cu toate acestea, deoarece toate canalele nu trec simultan către această stare (există variabilitate inerentă între activitatea canalelor de Na^+), există o perioadă de timp când unele canale sunt disponibile și altele nu. În această perioadă, este nevoie de un stimul mai mare decât normal pentru a recruta numărul necesar de canale pentru a declanșa un potențial de acțiune din numărul redus de canale disponibile; această perioadă definește perioada *refractară relativă.* Activitatea canalelor de K^+ voltaj dependente închise susține și extinde perioada *refractară relativă.* Atâta timp cât unele dintre aceste canale sunt deschise, va fi nevoie de un stimul mai mare decât normal pentru a depolariza membrana până la prag. Numai atunci când toate canalele de Na^+ s-au resetat și toate canalele de K^+ voltaj dependente au fost închise, un stimul prag normal va fi suficient pentru a obține un nou potențial de acțiune.

Deschiderea canalelor de Na^+ voltaj dependente este foarte sensibilă la rata de depolarizare față de prag. Dacă membrana este depolarizată foarte lent, canalele de Na^+ încep să treacă la starea "inactivă și indisponibilă", reducând astfel numărul de canale care pot fi recrutate pentru a declanșa un nou potențial de acțiune.

Ca un exemplu, să considerăm un caz care implică ischemie sau anoxie locală în creier sau inimă unde celulele sunt împachetate strâns împreună și spațiul extracelular este o mică fracțiune de spațiu intracelular. ATP-ul intracelular este rapid (câteva secunde) epuizat ducând la inhibarea Na^+-K^+ATP-azei. Gradienții de ioni încep imediat să se prăbușească; Na^+ intră în celulă, K^+ părăsește celula. Cu toate acestea, deoarece K^+ părăsește celula în spațiul extracelular, concentrația K^+ externă, care la început era aproximativ 4 mM, poate crește rapid la 6 sau 7 mM. Mai mult, această creștere rapidă a K^+ în exterior poate să apară înainte de a fi avut loc o schimbare importantă în concentrația intracelulară a K^+, pur și simplu pentru că spațiul extracelular poate fi destul de mic comparativ cu volumul citoplasmei din unele țesuturi. În termeni absoluți, schimbarea concentrației K^+ nu este mare. Cu toate acestea, raportul dintre [K]in și [K]out este semnificativ afectat. Luați în considerare că dacă concentrația K^+ din interior se modifică de la 140 mM la 138 mM și concentrația K^+ în exterior se modifică de la 4 mM la 7 mM, potențialul K^+, conform ecuației Nernst, se va modifica de la -93 mV la -78 mV. Schimbarea treptată a potențialului membranar "de repaus" de această magnitudine poate avea un efect profund asupra stării de inactivare a canalelor Na^+, influențând astfel capacitatea acestor celule de a declanșa potențialul de acțiune. Aceasta se dovedește a fi o problemă gravă în țesuturile cardiace după evenimente ischemice (de exemplu, infarct miocardic).

VIII.3. Fenomene bioelectrice musculare

Proprietățile electrice ale miocitului

Celulele musculare au comportament bioelectric ca orice altă celulă excitabilă, în general (pentru mușchiul scheletic):

- potentialul membranar de repaus este de aproximativ -90 mV
- potențialul de acțiune durează aproximativ 2 - 4 ms
- potențialul de acțiune se deplasează cu o viteză de aproximativ 5 m/s de-a lungul fibrei musculare
- perioada refractară absolută este de 1 - 3 ms
- distribuția ionilor prin membrana fibrei musculare este similară cu cea a membranei nervoase
- depolarizarea este legată de influxul de Na^+ și repolarizarea de efluxul de K^+, precum și la alte celule excitabile.

Există, totuși, mici diferențe în valoarea stimulului prag al diferitelor tipuri de fibre musculare, precum și în amplitudinea potențialului de acțiune înregistrat care este proporțional cu intensitatea curentului de stimulare dintre prag și intensitățile maxime ale curentului.

Tabel VIII.3.1. Concentrația ionică intracelulară și extracelulară în mușchiul scheletic al mamiferelor (distribuție la starea de echilibru)

	Concentrație (mmol/L)	
Ioni	*intracelular*	*extracelular*
Na^+	12	145
K^+	155	4
H^+	$13x10^{-5}$	$3,8x10^{-5}$
Cl^-	3,8	120
HCO_3^-	8	27
Anioni ($^-$)	155	0
Potențial membranar de repaus = -90mV		

Relația dintre evenimentele electrice și mecanice din mușchi

Un singur potențial de acțiune provoacă o scurtă contracție musculară urmată de relaxare, răspuns care se numește *"șoc muscular"*. Răspunsul muscular începe la aproximativ 2 ms după începutul răspunsului electric, i.e. adică începutul depolarizării și înainte de finalizarea procesului de repolarizare. Durata răspunsului muscular, *șocul*, depinde de tipul mușchiului, fiind între 7,5 ms (mușchii "rapizi") și 100 ms (mușchii "lenți").

BAUMAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

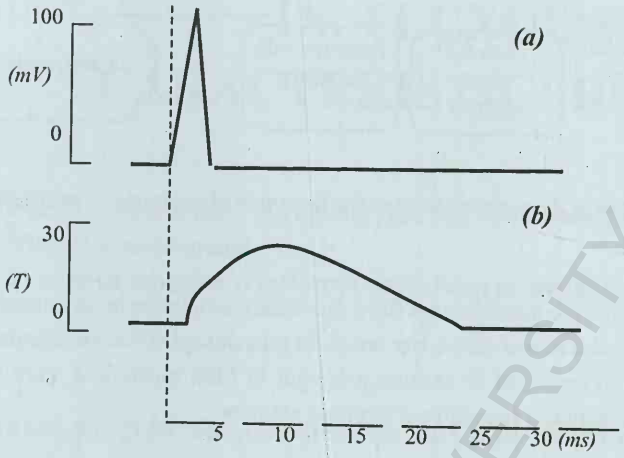


Figura VIII.3.1. Diagrama răspunsurilor electrice(a) și mecanice corespondente(b) a fibrelor musculare scheletice, la mamifere, la un singur stimul maxim (T = tensiune, în unități arbitrare)

Anumiți pași sunt urmăriți în relația biopotențial - răspuns muscular:

a) contracție:

1) Descărcarea neuronului motor
2) Eliberarea neurotransmițătorului (acetilcolină) la placa motorie
3) Cuplarea acetilcolinei cu receptorii acetilcolinici
4) Creșterea conductivității pentru Na^+ și K^+ în membrana placii motorii
5) Generarea potențialului plăcii motorii
6) Generarea potențialului de acțiune în fibrele musculare
7) Propagarea depolarizării de-a lungul tubulilor T
8) Eliberarea Ca^{++} din cisternele terminale ale reticulului sarcoplasmic și difuzia la filamentele groase și subțiri
9) Legarea Ca^{++} de troponina C, descoperirea situsurilor de legare a miozinei pe actina
10) Formarea legăturilor încrucișate între actină și miozină și alunecarea filamentelor subțiri pe filamente groase, producând scurtarea mușchiului.

b) relaxare:

1) Ca^{++} este pompat înapoi în reticulul sarcoplasmic
2) Eliberarea Ca^{++} de pe troponină
3) Încetarea interacțiunii dintre actină și miozină.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

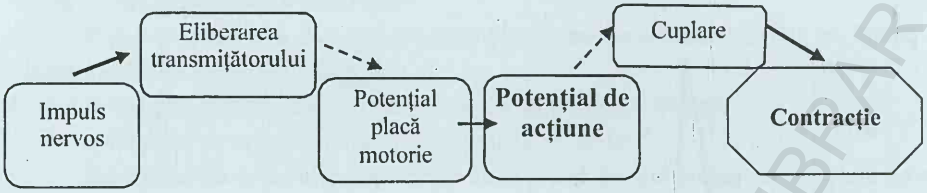


Figura VIII.3.2. Secvența de evenimente pentru fenomenul excitație - contracție

Stimulul normal pentru contracția unei fibre musculare scheletice la un animal viu este un impuls la nivelul nervului motor care o inervează. În mușchii spinali ai vertebratelor acest impuls nervos duce la un potențial de acțiune propagat la fibra musculară, care este apoi urmat de o contracție musculară, așa cum s-a explicat anterior.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IX. FLUXUL SANGUIN: CARACTERISTICI BIOFIZICE

IX.1. Fluxul sanguin: flux Newtonian, flux nonNewtonian, flux laminar şi turbionar
IX.2. Viscozitatea sanguină
IX.3. Presiunea sanguină şi influenţa elasticităţii peretelui vascular

---

IX.1. Fluxul sanguin: flux Newtonian, flux non-Newtonian, flux laminar şi turbionar

Fluidele se împart în *Newtoniene* şi *non-Newtoniene*. Fluidele *Newtoniene* sunt descrise de *legea fundamentală a lui Newton*, viscozitatea fiind aceeaşi în toate punctele, indiferent de forţele de forfecare (stress tangenţial) sau de deformare. *Modelul viscozităţii Newtoniene* poate fi aplicat în cazul a numeroase tipuri de fluide, implicit apa şi aerul. Tot în aceeaşi categorie pot fi incluse atât soluţiile reale (soluţiile non-electrolitice diluate), cât şi sistemele coloidale de concentraţie mică.

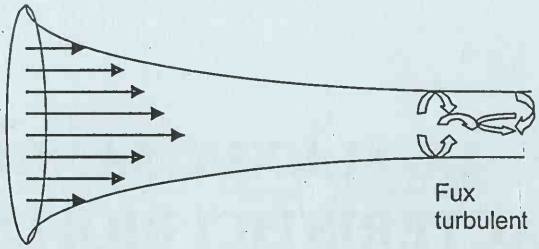
Legea fundamentală a lui Newton este:

$$F = \frac{\eta \cdot S \cdot v}{x}$$

unde: F = *forţa dintre două straturi*
S = *suprafaţa stratului*
x = *distanţa dintre 2 straturi*
v/x = *gradientul de viteză al stratului*
η = *factor de proporţionalitate (coeficientul de viscozitate dinamică)*

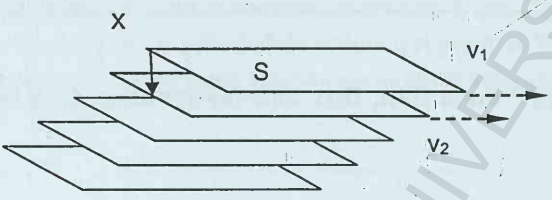
Înţelegerea fluxului laminar este esenţială în abordarea clasică a explicării fluxului sangvin. În volumul unui lichid ce curge printr-un tub ne putem imagina existenţa unor straturi monomoleculare adiacente paralele, cu un gradient de viteză al straturilor dv/dx, denumit flux laminar. Notăm suprafaţa straturilor monomoleculare cu S, iar distanţa dintre două straturi adiacente cu x. Între cele două straturi adiacente, care se deplasează cu vitezele v_1 şi v_2, acţionează forţe care pot fi calculate cu ajutorul *ecuaţiei fundamentale a lui Newton*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Flux laminar

a) flux laminar versus flux turbulent



b) flux laminar

Figura IX.1.1 Diagrama flux laminar versus flux turbulent (turbionar)

Din relaţia anterioară, se poate defini un factor de proporţionalitate, η, denumit coeficient de viscozitate dinamică, pentru curgerea laminară a fluidului.

Astfel, coeficientul de viscozitate dinamică este numeric egal cu forţa dintre două straturi adiacente dintr-un fluid în curgere, ambele straturi având suprafaţa egală cu 1, fiind paralele cu direcţia de curgere şi având un gradient al vitezelor de deplasare egal tot cu 1. Pentru fluidele Newtoniene, coeficientul de viscozitate este o constantă intrinsecă, ce variază doar în funcţie de temperatură; astfel vâscozitatea soluţiei depinde de tipul de fluid.

Dacă *ecuaţia fundamentală a lui Newton* nu se poate aplica într-un sistem fluidic, atunci acel fluid este ***non-Newtonian*** (sisteme coloidale de concentraţie mare, sisteme macro- moleculare, gelurile).

IX.2. Viscozitatea sanguină

Sângele este un fluid non-Newtonian, alcătuit din 2 faze: partea fluidă - plasma - şi o suspensie de hematii, leucocite şi trombocite; şi este caracterizat prin parametri reologici, dintre care cel mai important este viscozitatea. *Hemoreologia* este o *ramură medicală dedicată studiului fiziologiei şi fiziopatologiei complexe a fluxului sangvin.* Numărul şi proprietăţile eritrocitelor reprezintă factorii principali în definirea proprietăţilor reologice

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ale acestui fluid biologic. Eritrocitele sunt discuri biconcave (cu diametrul de aprox. 7,5 μm pentru eritrocitul adult) care datorită deformabilității lor se pot deplasa prin vase mai mici decât diametrul lor. În același timp, diametrul capilarelor din sistemul cardiovascular este aproape același cu diametrul eritrocitelor. Un adult are în jur de 5 milioane de eritrocite/mm^3. Hematocritul reprezintă, procentual, volumul ocupat de eritrocite din întreg volumul sangvin, la adulți fiind în mod normal în jur de 45%.

Comparativ cu celelalte elemente celulare, leucocitele sunt celule sferice, cu un diametru de aproximativ 7 μm și reprezintă cam 0,3% din volumul sangvin; nici leucocitele și nici trombocitele (mult mai mici ca volum decât hematiile sau leucocitele) nu sunt prezente într-un procent într-atât de semnificativ pentru a influența parametrii reologici ai sângelui.

Viscozitatea este un parametru reologic al fluidelor, o constantă dependentă de temperatură. În termeni cotidieni, sintagma "lichid vâscos" se referă la proprietatea unui fluid de a curge. La aceeași temperatură, mierea curge mai greu decât uleiul, care la rândul lui, curge mai greu decât apa.

În medicină, acest parametru este întrebuințat în diagnostic, fiind un indicator al fluidelor corpului. Fluidele biologice au viscozități diferite. Se poate afirma că viscozitatea depinde de tipul fluidului.

La o altă scară biologică, viscozitatea membranei celulare este în directă relație cu funcționarea optimă a proceselor celulare.

Sângele are un flux non-laminar, turbionar: elementele celulare tind spre a se acumula în mijlocul lumenului vascular, plasma fiind că un strat de sine stătător interpus între peretele vascular și partea centrală; acest fenomen este cu atât mai evident cu cât crește viteza de curgere a sângelui. În general, sângele este considerat un fluid non-Newtonian cu viscozitate structurală, bifazică. *Vâscozitatea totală a sângelui variază în funcție de:*

a) Numărul de eritrocite:

	Eritrocite/mm^3	Hematocrit	Viscozitate
normal	4,5 M	42	3,8
poliglobulie	5,0 M	47	4,4
	6,5 M	58	6,0
	10 M	79	15,0

(unde M = milioane)

b) Volumul eritrocitelor:

Viscozitatea sanguină variază în funcție de numărul de celule (eritrocite, leucocite, trombocite) dar și de proteinemie și de tipul proteinelor sangvine, elasticitatea și diametrul vaselor sangvine, forța contractilă a pompei miocardice etc.

Există mai multe metode pentru a determina coeficientul de viscozitate al plasmei sau serului. *Viscozimetrul capilar* ***Ostwald*** este metodă de rutină, pe care o studiați și la lucrările practice. *Viscozimetrele rotaționale* sunt cele mai logice, chiar și pentru sânge

integral. Se determină coeficienţii de viscozitate relativi *(raportul între coeficientul de viscozitate al lichidului de interes şi coeficientul de viscozitate al lichidului de referinţă - apa distilată la 20°C, η_0=10 p = 1 Nsm ^{2}).*

Mai pot fi calculaţi şi alţi coeficienţi de viscozitate (ex. coeficientul de viscozitate cinematică: raportul dintre coeficientul de viscozitate dinamică şi densitate).

Unitatea de măsură în S.I. pentru coeficientul de viscozitatea dinamică este:

$$<\eta>SI = Nsm^{-2} = Pa\ s$$

iar în **sistemul CGS** (centimetru-gram-secundă) este:

$$<\eta>SI = dine*s*cm^{-2} = p$$

(poise).

10 poise = 1 Pa s (submultipli - centpoise: 1cp = 10^{-2} poise = 10^{-3} Nsm^{-2})

Variaţii ale viscozităţii sanguine

Creşterea viscozităţii sangvine acompaniată de tabloul clinic specific, reprezintă sindroamele de hiperviscozitate, cu o paletă largă de posibile etiologii. Unele dintre cele mai des întâlnite forme de hiperviscozitate sangvină sunt determinate de concentraţia crescută a proteinelor sangvine (hiperproteinemia), uneori asociată cu proteine anormale (paraproteinoza) sau de un număr crescut de elemente celulare (poliglobulia).

Tabel IX.2.1. Coeficientul de viscozitate relativă – fluide biologice

Lichid	η_r
Sânge integral	*4,75 (3,8-5,7)*
Plasmă	1,8-2,4
Ser	1,64-1,69
LCR	1,02-1,027
Lichid sinovial	46,3 (26,9-65,7)
Bilă - duct hepatic - colecist	 1,27 (1,07-1,75) 2,85 (1,31-5,42)
Urină	1,0-1,14

Tabel IX.2.2. Coeficient de viscozitate relativă - fluide nebiologice

Lichid	η_r
Apă	1
Alcool etilic	1,2
Benzen	0,65
Glicerină	830
Ulei de ricin	960

Creşterea viscozităţii interne a eritrocitului sau a viscozităţii membranare a acestuia are consecinţe asupra capacităţii de deformare a hematiei (ex. drepanocitoza sau unele hemoglobinopatii), iar prin modificări patologice ale hemoglobinei, dar şi prin hemoliză, se produc modificări ale viscozităţii şi la nivel sanguin.

Alte patologii care pot influenţa viscozitatea sangvină: infarctul miocardic, accidentul vascular cerebral, hipoxia, acidoza etc. Hipoproteinemia, sau hemodiluţia prin transfuzii de ser fiziologic sau plasmă scad viscozitatea sangvină.

Variaţii fiziologice ale viscozităţii sangvine în funcţie de: sex (femei<bărbaţi), vârstă (copil<adult), tipul de sânge (arterial<venos).

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IX.3. Presiunea sanguină şi influenţa elasticităţii peretelui vascular

Presiunea sangvină este un alt parametru cu semnificaţie reologică. Sângele curge prin sistemul nostru cardio-vascular datorită diferenţelor de presiune din regiuni diferite ale sistemului. Debitul sangvin intre oricare 2 puncte din organism este direct proporţional cu diferenţa de presiune dintre cele 2 puncte, iar direcţia de curgere este mereu în raport cu gradientul presional (de la punctul cu cea mai mare presiune la cel cu cea mai mică presiune). Relaţia de condiţionare a debitului sangvin *(F)* de către presiunea sangvină *(P_1-P_2)* este exprimată în ecuaţia:

$$F = k(P_1-P_2)$$

Coeficientul *k* este o constantă de proporţionalitate care cuantifică eficienţa cu care diferenţa presională se traduce în curgerea fluidului (<1), şi este o măsură a nivelului de rezistenţă *R* la curgere *(k=1/R)*.

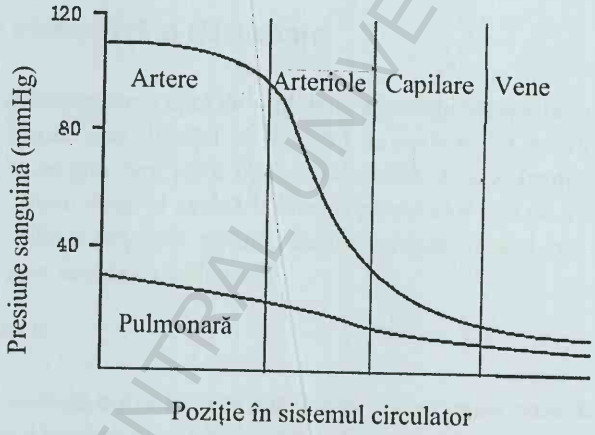


Figura IX.3.1. Relaţia dintre tipul de vas sanguin şi presiunea sanguină

Presiunea sanguină (BP) este determinată de debitul cardiac (C) şi rezistenţa periferică totală R_r:

$$BP=C \times R_R$$

Rezistenţa la curgere depinde de aria de secţiune, lungimea şi tipul vasului (neted sau nu) dar şi de proprietăţile fluidului care se deplasează prin vas (mai ales viscozitatea).

Debitul cardiac se modifică ori prin creşterea frecvenţei cardiace ori a volumului-bataie. Însă, principalul factor determinant pentru variaţiile presionale din sistemul cardio-vascular este rezistentă periferică.

Influenţa elasticităţii pereţilor vasculari

Pereţii vasculari din corp, şi mai ales arterele mari, sunt elastici. Pentru a studia influenţa elasticităţii asupra fluxului sangvin au fost propuse câteva modele teoretice. În 1899, ***Frank*** a fost cel care dezvoltat prima teorie a fluxului sangvin în aortă. Se

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

presupunea că aorta se comportă ca un rezervor elastic: volumul şi presiunea instantanee sunt în interdependenţă printr-o ecuaţie de echilibru iar debitul de eflux din aortă este în strânsă relaţie cu rezistenţa periferică. Cunoscând ecuaţia de echilibru a unui tub de rază R, grosime h şi modulul E (modulul ***Young***), aflat sub acţiunea unei presiuni interne p, se poate calcula cu cât s-a modificat volumul. Dacă modificarea de calibru a vasului este mică, comparativ cu cel iniţial, atunci orice modificare de volum este aprox. proporţională cu presiunea aplicată, iar debitul este determinat de rezistenţa periferică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

X. ELEMENTE DE BIOFIZICA RESPIRAȚIEI

X.1. Ventilație pulmonară și elasticitate
X.2. Biofizica surfactanctului pulmonar

X.1. Ventilație pulmonară și elasticitate

Funcția respiratorie are scopul de a permite absorbția aerului din mediul ambiant în plămâni, unde oxigenul este absorbit și dioxidul de carbon din interiorul corpului este descărcat; acest proces prin care aerul intră (este inhalat) și iese (expirat) din plămâni se numește ventilație. Rolul clinic al evaluării funcției plămânilor este de a descrie, în termeni cantitativi, cât de bine o persoană respiră, această evaluare având rol diagnostic sau în monitorizarea evoluției unei boli respiratorii.

Frecvența respiratorie

Cantitatea totală de aer ce intră în plămâni în fiecare minut poate fi determinată prin intermediul frecvenței respiratorii. Aceasta depinde de vârstă: 60/min la nou-născut, 30-40/min la vârsta de 1 an, 12-15/min la adult. În general frecvența respiratorie crește pe măsură ce greutatea organismului scade (un elefant are o frecvență respiratorie de aproximativ 4/min, pe când un șobolan 200/min). Acest lucru poate fi exprimat prin elemente fizice care sunt folosite pentru a obține o frecvență respiratorie optimă cu un minim de efort. Atât forța elastică cât și forța inerțială sunt implicate în extinderea plămânilor, iar aceste forțe se pot echilibra la o anumită frecvență rezonantă pentru a realiza extinderea cu un minim de efort. Echilibrul dintre cele două forțe poate fi exprimat în unele ecuații, având frecvența rezonantă:

$$frecventa = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{E}{m}}$$

unde: m este masa corporală (din expresia forței inerțiale) și E este un coeficient (din expresia forței elastice)

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conform acestei relații s-ar putea deduce ca frecvența respiratorie normală ar fi invers proporționala cu rădăcina pătrată a masei corporale, afirmație care verifică și explică datele menționate mai sus.

Complianța pulmonară

Modificarea în volum a plămânului pe unitatea de schimb a presiunii aerului ($\Delta V/\Delta P$) reprezintă complianța pulmonară. Se măsoară în mod normal într-un interval de presiune, unde curba de relaxare presionară este abruptă; valoarea normală este aproximativ 0.2 l/cm H_2O. Complianța reprezintă o măsurare statică pentru plămân. Ea depinde de volumul pulmonar (un individ cu un singur plămân prezintă aproximativ jumătate din ΔV pentru un ΔP dat).

Funcția respiratorie și ecuația mișcării pulmonare

Mușchii respiratori, inclusiv mușchii inspiratori (mușchii intercostali externi), mușchii expiratori și mușchiul diafragm au rol în modificarea volumelor pulmonare. Mușchiul diafragm reprezintă 75% din schimbarea volumului intratoracic în timpul unui inspir de repaus. Aceștia participă în realizarea respirației. Funcția respiratorie este realizată de mușchii respiratori (având presiunea musculară P_M) prin întinderea țesutului elastic de la nivelul cutiei toracice și a plămânilor (fiind reprezentată de presiunea elastică, P_E), mișcarea țesutului neelastic (rezistența vâscoasă, P_V) și mișcarea aerului prin pasajele respiratorii (dată de presiunea inerțială, PI).

Cu simbolurile definite mai sus, se poate scrie o ecuație, în cadrul mișcărilor respiratorii, incluzând toți factorii care sunt implicați

$$P_M = P_E + P_V + P_I$$

Fiecare factor are o anumită implicare cantitativă în realizarea funcției respiratorii

Tabel X.1.1. Componentele care participă la realizarea funcției respiratorii în timpul inspirului de repaus și contribuția lor

Participant	*Procentaj*
Rezistența vâscoasă	7%
Rezistența căilor aeriene	28%
Presiunea elastică	65%

X.2. Biofizica surfactantului pulmonar

Surfactantul este lichidul ce se găsește pe peretele alveolelor având rolul de a asigura elasticitatea necesară alveolelor în cadrul schimburilor alveolare din timpul respirației.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Surfactantul pulmonar este un produs de secreție a pneumocitelor tip II cu proprietăți active pe suprafața marcată, alcătuit în principal din lipide, câteva proteine și carbohidrați.

Tabel X.2.1. Compoziția surfactantului

Componente	*Procent compoziție*
Fosfatidilcolina	62
Fosfatidilglicina	5
Fosfolipide	10
Lipide neutre	13
Proteine	8
Carbohidrați	2

Activitatea surfactantului este atribuită în mare măsură prezenței fosfolipidei, dipalmitoil-fosfatidilcolina, care este sintetizată cu puțin timp înainte de naștere, la sugarii născuți la termen. Acesta este motivul pentru care în multe cazuri de nou- născuți prematuri poate apărea un sindrom de detresă respiratorie datorită deficienței surfactantului pulmonar.

Pentru a întelege rolul surfactantului în elasticitatea peretelui, trebuie să facem o presupunere despre alveole. Alveolele se contractă de aproximativ 15.000 de ori pe zi; oxigenul și dioxidul de carbon sunt transportate prin membrana alveolară, tensiunea de la nivelul acesteia depinzând atât de structura membranei cât și de prezența surfactantului pe suprafața sa internă.

Daca am considera alveolele ca fiind mici sfere cu orificii foarte mici, putem aplica ***legea lui Laplace:***

$$r(P_i - P_0) = r\Delta P = 2\gamma$$

unde: $\Delta P = P_i - P_0$ *=diferența de presiune între interior –* P_i *și exterior –* P_0*, cavitatea pleurală – a sferei ce reprezintă alveola,* γ *= tensiunea de la nivelul peretelui (definită ca fiind forța pe unitate de lungime),* r *= raza sferei.*

Această relație demonstrează că pentru o membrană sferică în echilibru raza înmulțită cu diferența de presiune trebuie să fie egală cu dublul tensiunii peretelui.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

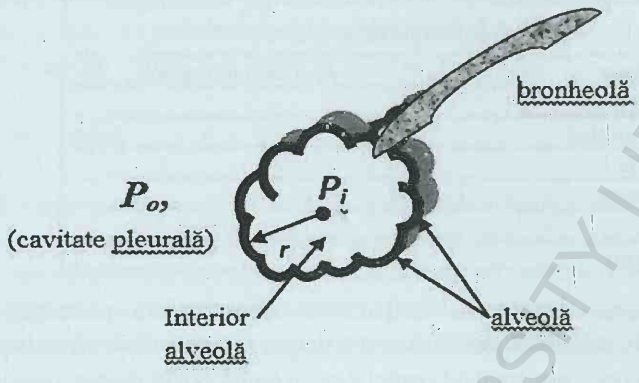


Figura X.2.1.Mușchiul diafragm cu alveolă la extremitatea unei bronhiole, ramificația finală a bronhiei și semnificația simbolurilor

În alveolă presiunea pleurală P_0 crește în expir, determinând o scădere a ΔP. În același timp, prin contracție musculară, scade *r* (raza alveolei). Dacă *r* și ΔP scad și g este constant, condiția de echilibru prezentată în ecuația de mai sus nu poate fi realizată. Forța determinată de pereți, din exterior spre interior, va fi mai mare decât forța obținută prin diferența de presiune și exercitată din interior spre exterior în alveolă. Acest proces duce la colabarea alveolei. Când aerul din atmosferă intra în plămân, presiunea pleurală scade și raza alveolei crește; nici de această dată condiția de echilibru nu poate fi realizată, iar alveola are tendința de a se dilata și a se rupe.

În stările normale aceste manifestări periculoase nu se petrec fiind evitate datorită prezenței surfactantului. Acest fluid conține lipoproteine cu formă alungită care au tendința de a se aranja singure paralel, dând astfel elasticitate membranei. Când raza alveolei crește, în inspir, spațiul dintre proteinele surfactantului crește, tensiunea la nivelul peretelui crește și condiția de echilibru este respectată. În expir, atât raza cât și spațiul dintre moleculele surfactantului scade, același lucru petrecându- se și la nivelul tensiunii peretelui.

Rolul surfactantului este, în principal, de a modifica tensiunea peretelui pentru a putea fi respectată condiția de echilibru. Alte roluri sunt atribuite componentelor surfactantului. De exemplu, proteina A a surfactantului pulmonar (hSP-A) este implicată în captarea precoce și fagocitoza patogenului *Mycobacterium tuberculosis* de către macrofagele alveolare.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

XI. BIOFIZICA SISTEMELOR SENZORIALE

XI.1. Semnale fizice și mesaje senzoriale
XI.2. Biofizica receptorului auditiv
XI.3. Mecanisme biofizice ale receptorului vizual
XI.4. Receptorul olfactiv și gustativ
XI.5. Psihofizica: legea lui Weber-Fechner

XI.1 Semnale fizice și mesaje senzoriale

Corpurile vii (organismele multicelulare) primesc informații atât din mediul intern cât și extern cu ajutorul unor sisteme de organe specializate. Aceste structuri **primesc** stimuli specifici din diversele medii, transformați (prin diferite mecanisme) în informații ce sunt **transmise** mai departe creierului, dând posibilitatea unor **răspunsuri** adecvate ale organelor efectoare; spre exemplu, există cu certitudine o coordonare ridicată între informația sezorială și acțiunea mușchilor în conducerea unui autovehicul, explicată de faptul că simțurile fac parte din sisteme complicate de **control prin feedback**.

Cu toate că felul percepției senzoriale este destul de diferit (radiații electromagnetice pentru văz, vibrații mecanice pentru auz, presiune mecanică și temperatură pentru simțul tactil, molecule chimice pentru miros și gust), toate sunt transformate în același tip de informație la nivelul organului senzorial, fiind numite, tocmai din acest motiv, **analizatori:** ei transformă o forma de energie în alta, traduc informații dintr-un cod în altul ce poate fi procesat ulterior de sistemul nervos. *Analizatorii* sunt numiți și *structuri receptoare* sau *organe de simț* (precum ochiul pentru văz sau urechea pentru auz).

BCU "Ion Creangă" UNIVERSITY LIBRARY

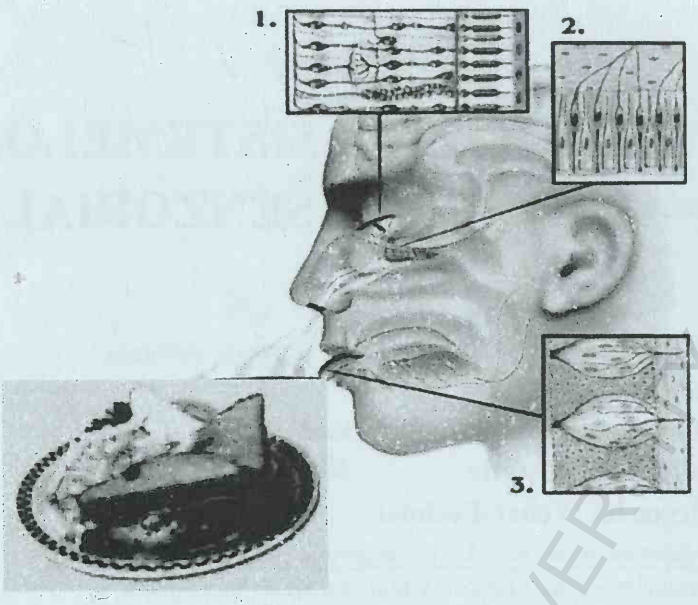


Figura XI.1.1. Diferite sisteme senzoriale sunt implicate în senzaţiile create de mâncare: miros (1), vizual (2), gust (3) (107, modif.)

Când sunt stimulate cu stimuli specifici (sau unii nespecifici dar lezionali), aceste structuri receptoare vor iniţia, dupa un proces de transducere (mai mult sau mai puţin cunoscut şi/sau complex) descărcări nervoase sub forma unor potenţiale de acţiune; acestea sunt transmise de creier în cod binar (actiuni „on-off") iar creierul oferă răspunsurile adecvate (mai exact, senzaţii specifice tipului de organ receptor). Aceste aspecte creează concepte noi, provenite din domenii precum cel al teoriei informaţiei, reţele neuronale artificiale, cibernetică (vezi şi ***Capitolul II.6***).

XI.2. Biofizica receptorului auditiv

Sistemul auditiv al vertebratelor este un exemplu de transducere de semnal fără uzul moleculelor mesager secunzi.

Pe scurt, forţa mecanică a undelor sonore detectate de celule specializate („celule ciliate") deschide un tip de canal ionic al celulelor, via un mecanism direct. Sistemul pare a fi influenţat de concentraţia ionilor de calciu; calbindina, o proteină ce leagă Ca^{2+}, s-a descoperit a fi asociată cu sistemul auditiv murinic. Miozina pare a fi de asemenea implicată în acest proces.

Celulele receptor responsabile de percepţia sunetelor la mamifere sunt, cu toate acestea, conţinute în *cohlee*. Aceasta fiind compusă dintr-o crescătură tubulară a labirintului membranos, din *scala media*, inconjurată de doua crescături tubulare a labirintului osos, din *scala vestibuli* şi din *scala tympani*. Celulele receptor („celulele ciliate") sunt fixate pe membrana bazilară iar cilii în sine, sunt inseraţi în membrana

tectorială (tot acest complex formând *organul lui Corti*); astfel este de aşteptat ca aceste celule să fie stimulate de mişcări ale membranei bazilare şi tectoriale în relaţie una cu cealaltă. Sunt în jur de 25 000 celule ciliare în cohleea umană; la pisică sunt prezente în jur de jumătate din acest număr, inervate de aproximativ 50 000 fibre nervoase.

De altfel, undele sonore ce intră în urechea externă cauzează vibraţii ale timpanului, ce sunt transmise prin urechea medie, umplută cu aer, de o serie de oscioare mici (oscioarele auditive) numite *ciocănaş, nicovală* şi *scăriţă.* Aceste oscioare formează un aşa zis „dispozitiv de sincronizare a impedanţei" în aşa fel încât forţele asupra unei suprafeţe relativ mari a membranei timpanice (50-90 mm^2 la om) sunt concentrate pe o suprafaţă destul de mica (3,2 mm^2) a bazei scăriţei. Această concentrare a forţelor produce o creştere a presiunii, suficientă pentru a transmite undele sonore, de la aerul exterior spre lichidul perilimfatic al urechii interne. Daca nu ar exista un astfel de mecanism, şi membrana timpanică ar fi fost în contact direct cu lichidul, energia sonoră ar trece de interfaţa aer/lichid doar în proporţii foarte mici – restul fiind reflectată.

Baza scăriţei stă pe o membrană mică, *fereastra ovală*, ce acoperă un spaţiu în os în care urechea internă este fixată. În spatele acesteia există perilimfa rampei vestibulare, iar orice mişcare înspre interior a scăriţei, cauzează o deplasare a lichidului de-a lungul rampei vestibulare. Această deplasare este acompaniată de mişcări ale membranei bazilare şi o deplasare de lichid corespondentă în rampa timpanică, ce rezultă în final intr-o denivelare în *fereastra rotundă*, membrană intermediară între rampa timpanică şi urechea medie. Membrana tectorială se mişcă în sus şi în jos împreună cu membrana bazilară, existând şi o acţiune de forfecare între acestea, ce deplasează cilii celulelor, oferind astfel stimulul imediat pentru excitaţia acestora.

XI.3 Mecanisme biofizice ale receptorului vizual

Structurile receptoare cu afinitate pentru lumină sunt găsite în majoritatea organismelor vii, începând cu formele primitive de viaţă, ce au receptori pentru fototaxie sau fotokineză (mişcare indusă de lumină) în unele plante sau unele alge, mergând până la mult mai evoluatul organ specializat numit ochi.

În ochi, o imagine din mediul extern este proiectată pe un „ecran" format din celule fotosensibile, după ce aceasta a trecut printr-un sistem de lentile, precum intr- un aparat foto. Formarea imaginii este simplă (precum în unele structuri ale animalelor marine, numite găuri stenopeice) sau complexe (precum ochii vertebratelor).

În ochiul vertebratelor celulele receptoare se găsesc în *retină*, incluse într-un strat epitelial pigmentat. Lumina trebuie să treacă printr-un strat de ţesut înainte să ajungă la receptori. Stratul epitelial conţine un pigment negru ce serveşte la reducerea

BCU MS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

luminii împrăştiate. Acuitatea vizuală nu este la fel de-a lungul întregii retine: cea mai precisă este în zona centrală, numită *fovea* şi este complet absentă în *„pata oarbă"*, porţiunea prin care fibrele nervoase optice parasesc ochiul.

Două categorii de celule receptoare vizuale se găsesc în ochiul vertebratelor, numite *bastonaşe* (specializate pentru vederea pe intuneric) şi *conuri* (specializate pentru vederea în lumina puternică şi a culorilor). Aceste celule diferă în organizarea lor şi în pigment. În bastonase acest pigment este ***rodopsina***, un compus constituit dintr-o proteină numită ***opsină*** şi un cromofor, ***retinalul***, ce este un derivat al vitaminei A, responsabil pentru absorbţia luminii. Cu toate că rodopsina este cea mai abundentă, nu este singurul pigment vizual găsit în natură, mai mult, toate pigmentele sunt complexe specifice diferite a opsinei şi retinalului. Opsina determină spectrele specifice de absorbţie a retinalului, făcând astfel posibilă vederea culorilor.

Retinalul este găsit sub două forme corespondente celor două forme de vitamina A. Cea mai comuna formă este *retinalul-1*, găsit atât în rodopsină cât şi în majoritatea pigmenţilor celulelor cu conuri.

Principala bandă de absorbţie a rodopsinei corespunde la aproximativ 50 nm, fiind cea mai eficientă lungime de undă pentru vederea umană în lumina slabă (unde vederea cu bastonaşe este predominantă, prin rodopsină). În lumina puternică (vedere cu conuri) vârful curbei lungimii de undă a vizibilitaţii este în jur de 550 nm (aproape de rata maximă de absorbţie a pigmenţilor celulelor cu conuri).

Studii experimentale arată că rodopsina pare a fi o proteină transmembrananră cu şapte segmente α–helix hidrofobe, legate împreună prin bucle ce ies afară în spaţiul intern citoplasmatic şi tilacoid. Cromoforul (retinal) este inserat adânc înauntrul moleculei.

Mecanisme de recepţie ale văzului

La ochi, celulele senzoriale pigmentate transformă stimulul luminii intr-un semnal electric. Celulele bastonas conţin discuri fotosenzitive, inconjurate de o membrană plasmatică; încastrate în membrana discurilor sunt molecule de rodopsină. Absorbţia unui singur foton de rodopsină poate închide în jur de 1000 – 3000 canale de sodiu pe secundă.

Rodopsina, proteină fotoreceptoare în discuri, traversează membrana de şapte ori. Conţine un cromofor retinal ataşat de o bază, pe un reziduu de lysina, ataşat mai departe în centrul bistratului membranar, la al 7-lea α–helix transmembranar.

La momentul absorbţei fotonilor, retinalul se izomerizează dinpre forma *cis* spre *trans*, printr-o serie de intermediari, unul dintre aceştia interacţionând cu o proteină G (transductina) catalizând schimbul de GDP legat, pentru GTP. Proteina G ce conţine GTP, activează apoi o fosfodiesterază ce hidrolizează cGMP în GMP. Niveluri mari de cGMP în celulă menţin canalul membranar al Na^+ intr-o configuraţie

deschisă iar lumina produce hiperpolarizarea, rezultând hidroliza cGMP și închiderea canalelor de sodiu.

Opsinele transductoare de lumină a bacteriilor și mamiferelor au fost investigate foarte mult. Exemplul cel mai exhaustiv documentat este cel al bacteriorodopsinei.

Toate opsinele au o formă și un aranjament similar în membrană, cu toate că există o slabă omologie directă a secvenței aminoacizilor între opsinele animale și cele bacteriene.

Opsinele aparțin familiei receptorilor cu o structură sau „motiv" general similar și sunt cuplate cu proteinele (G) reglatoare nucleotidice a guaninei, dar este de menționat faptul că bacteriorodopsina, ce acționează ca o pompă protonică, nu este cuplată cu proteinele G.

XI.4 Receptorul olfactiv și gustativ

Mirosul

Organul receptor în cazul ***mirosului (olfacției)*** este nasul. În celulele neuroepiteliale ale nasului au fost identificați ***receptori*** pentru detecția ***compușilor volatili*** cu structuri foarte diferite, dar senzația mirosului fiind adesea foarte similară. Cu toate acestea, sistemul olfactiv discriminează între concentrațiile sub-nanomolare a moleculelor din mediul înconjurator. Celulele receptoare olfactive sunt localizate în epiteliul nazal, fiind neuroni bipolari, cu o proiecție dendridică conținând un grup de 5-20 cili chemo-senzitivi, ce sunt în contact cu mucusul olfactiv.

Cilii olfactivi conțin în membrana plasmatică multe din componentele esențiale necesare pentru transducerea semnalului. Având în vedere gama largă de odoranți, există multiple categorii de proteine receptoare olfactive, și posibil chiar mai mult de un singur mecanism de traducere a semnalului chimic în semnal electric.

Receptorii odoranți par a fi controlați printr-o clasă de proteine G trimerice, numite G_{olf} (vezi și ***Capitolul VII.6.2.4. Receptorii asociați proteinelor G***). Stimulii activează o proteină G stimulatoare, astfel mărind sinteza de cAMP, care, mai departe, activează canalele ionice senzitive, conducând la depolarizarea membranei neuronale.

Gustul

Receptorii gustului sunt localizați în papilele gustative; aceștia conțin între 40-60 celule specializate, organizate în grupări. Receptorii sunt controlați de proteinele G, printr-o proteină G specifică gustului numita *gustducină*. Legarea liganzilor (molecule chimice) conduce la o eliberare de neurotransmițători din celulele gustative, cauzată fie de o depolarizare sau o hiperpolarizare a celulelor. Patru gusturi sunt recunoscute, fiecare conducând la un raspuns celular diferit.

Gusturile sărate sunt rezultatul unui blocaj a canalului Na^+ sau a K^+.

Gusturile dulci sunt mediate printr-o proteină G, cAMP și depolarizarea celulară. Recepția gustului de amar poate fi mediată fie prin cAMP sau prin calea intracelulară a calciului sau a inositol fosfatului.

XI.5. Psihofizica: legea lui Webber-Fechner

În discuţia despre simţuri şi percepţia lor, trebuie să distingem intre cantităţi obiective, măsurabile (frecvenţă, concentraţie) şi senzaţii subiective (volumul sunetului, gust, intensitate). Investigarea relaţiei dintre măsurile obiective şi subiective sunt esenţa domeniului numit psiho-fizică.

O lege esenţială în această stiinţă este numită legea lui ***Weber-Fechner***, importantă în comparaţia intensităţii a doi stimuli, indiferent de tipul lor, şi de intensitatea percepţiei acestora. Diferenţa în intensitatea stimulilor pe care suntem capabili în a-i percepe (PDD = prag de diferenţă) este o funcţie a însuşi stimulului. A fost demonstrat de ***Weber*** la mijlocul secolului al XIX-lea că această diferenţă de intensitate a stimulului PDD nu este o functie de ordin aritmetic, ci a raportului între magnitutidile stimulilor. Mai mult, în 1981, ***Daimask*** a exprimat această observaţie într-o definiţie formală: pragul/limenul de diferenţă (măsură în psiho-fizică, egală cu PDD la un anume punct pe scală) este o fracţiune constantă a stimulului

Baza legii lui ***Weber*** este aceea că o creştere în percepţie este egală cu o creştere în magnitudinea senzaţiei.

Expresia legii lui ***Weber-Fechner*** este:

$$dS = k\frac{dI}{I}$$

*unde: **k** este un factor de scalare introdus pentru a reprezenta orice creştere a senzaţiei, **dS** este o creştere a percepţiei, **I** este intensitatea stimulului.*

Dacă integram aceasta ecuaţie avem:

$$S = k \log I + C$$

expresie ce mai este cunoscută ca şi legea lui ***Weber-Fechner***.

Dacă constanta **C** este considerată a fi egală cu ***(–klog I_0)***, expresia devine:

$$S = k \cdot \log \frac{I}{I_o}$$

Acesta este un tip de relaţie ce este frecvent folosită pentru a exprima intensităţi diferite de stimuli, spre exemplu, intensitatea sunetelor, în decibeli.

Legea lui ***Weber-Fechner*** poate fi verificată prin teste clinice. Metoda de bază experimentală, necesară pentru a testa legea lui ***Weber*** este de a investiga gama intensităţii reale ce rezultă în aceeaşi intensitate percepută. Cantitatea constantă este aşadar percepţia iar stimulul este în fapt variabila. Spre exemplu dacă dorim să testăm simţul olfactiv, practic, aceşti subiecţi sunt rugaţi să categorisească mirosul în una din categoriile: niciun miros, miros abia perceptibil, distinct, moderat, puternic şi miros copleşitor. Rezultatele experimentale ale unui astfel de test, asupra a 5 sau 6 subiecţi, a arătat un acord puternic cu ecuaţia ***Weber-Fechner***. Concentraţia odorantului în aer variind între 0.00001 şi 100,000 părţi per milion, indicând că legea lui ***Weber*** este validă asupra unei game mari de intensităţi de stimuli.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

1. Aidley DJ, *The Physiology of Excitable Cells,* Cambridge University Press, Cambridge – Melbourne, 1991
2. Araki H, Brézin E et al, *Lecture Notes in Physics*, Springer, Berlin Heidelberg, 1997
3. Audigié Cl, Dupont G, Zonszain F, *Principes des méthodes d'analyse biochimique*, tome I-II, Doin Édition, Paris, 1995
4. Balaban AT, Banciu M, Pogany I, *Aplicaţii ale metodelor fizice în chimia organică*, Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1983
5. Belkin MI, Schwartz U, *New Biological Phenomena Associated with Laser Radiation*, Tel-Aviv University, Health Physics, 56 (5), 687-690, 1989
6. Berkes L, Györgyi S, Rontó G, Tarján I, Voszka R, *An Introduction to Biophysics With Medical Orientation*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1989
7. Bernard S, *Biochimie clinique: Instruments et Techniques de laboratoire*, Deuxième éd, Maloine, Paris, 1989
8. Bittman E, *Bioelectricitatea*, Ed Ştiinţifică, Bucureşti, 1969
9. Blasi F, Molecular mechanisms of protease-mediated tumor invasiveness, *J Surg Oncol*, Suppl, 1993, 3, 21-3
10. Bomberger AS, Dannenfelser BA, *Radiation and Health: Principles and Practice in Therapy and Disaster Preparedness,* Aspen, USA, 1984
11. Brown BH, Smallwood RH, Barber DC, Lawford PV, Hose DR, *Medical Physics and Biomedical Engineering*, Medical Sciences Series, Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia, 1999
12. Burgeat M, Grall Y,Loth D, *Physique et biophysique*, vol 3, Ed Masson et Cie, Paris, 1973
13. Butucelea A, *Tehnici noi în spectroscopie*, Ed Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1984
14. Cabane B, Hénon S, Le droit au mélange, *Pour La Science*, 277, 106-107, 2000
15. Cameron JR, Skofronick JG, *Medical Physics,* A Wiley-Interscience Publication JOHN WILEY&SONS, USA, 1978
16. Canet D, *La RMN - Concepts et méthodes*, InterEditions, Paris, 1991
17. Certaines J D, Bovée W M M J, Pardo F (Eds), *Magnetic Resonance Spectroscopy in Biology and Medicine*, Pergamon Press, 1992
18. Champe PC, Harvey RA, *Biochemistry,* Lippincott's Illustrated Reviews, JB Lippincott Company, Philadelphia, 1987
19. Ciurea AV, Ogrezeanu I, *Microdializa cerebrală*, Viaţa medicală, 16, 2, 2002
20. Cohen S, The epidermal growth factor, *Cancer*, 1983, 51, 1787-1791
21. Cole A, *Theoretical and Experimental Biophysics*, Marcel Dekker, Inc, New York, 1967
22. Corone C, Traceurs en oncologie nucléaire, *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 1999, 23, 1, 12-15
23. Crawford FS, *Curs de Biofizică Berkley – Unde*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1983
24. Daems WT, Burger EH, Afzelius BA, *Cell Biological Aspects of Disease,* Boerhaave Series, Leiden University Press, Hague, 1981
25. Dăneţ AF, *Metode instrumentale de analiză chimică*, Ed Ştiinţifică, Bucureşti, 1995
26. Darnell J, Lodish H, Baltimore D, *Molecular Cell Biology,* Scientific American Books, New York, 1990
27. Dauzat M, *Ultrasonographie Vasculaire Diagnostique,* Vigot, Paris, 1991
28. Desplaces A, Poupon MF, Le processus métastatique, *Bull Cancer,* 1994, 81, 751-754

29. Dimoftache C, Herman S, *Biofizicã medicalã,* Cerma, Bucuresti, 1993
30. Dintenfass L, *Rheology of Blood in Diagnostic and Preventive Medicine*, Butterworths, London – Boston, 1976
31. Duan D, Winter C, Cowley S, Hume JR, Horowitz B, Molecular identification of a volume-regulated chloride channel, *Nature*, 1997, 390, 417-421
32. Dulbecco R, Ginsberg HS, *Virology,* JB Lippincott Comp., Philadelphia, 1988
33. Duncan G, *Physics for Biologists,* Blackwell Scientific Publications, The Pitman Press, London, 1975
34. Duncan G, *Physics in the Life Sciences,* Blackwell Scientific Publications, The Alden Press, Oxford, 1990
35. Dutreix J, Desgrez A, Bok B, Chevalier C, *Physique et biophysique*, vol 4, Ed Masson et Cie, Paris, 1973
36. Elgazzar AH, Shebab D, Malki A, Abdulla M Musculoskeletal System In: Elgazzar A (edit) *The pathophysiologic basis of Nuclear Medicine*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2001
37. Heppner GH, Cellular Interactions in Metastasis, *Cancer and Metastasis Rev,* 1990, 9, 21-34
38. Farhi D, Smadja R, *Biophysique, PCEM1,* ESTEM, Paris, 1996
39. Fasquel M, Dumon J-P, Fasquel A-M, *Activités technologiques en Biochimie - 1 Méthodes d'analyse*, Centre Régional de Documentation Pédagogique d'Aquitaine, Bordeaux, 1995
40. Galzi JL, Revah F, Bessis A, Changeux JP, Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor From electric organ to brain, *Annu Rev Pharmacol,* 1991, 31, 37-72
41. Ganong WF, *Review of Medical Physiology,* Prentice-Hall International Inc, USA, 1991
42. Goodman SR, *Medical Cell Biology,* 2nd ed, Lippincott – Raven, Philadelphia, 1998
43. Gornall AG, *Applied Biochemistry of Clinical Disorders,* JB Lippincott Company, USA, 1986
44. Gougerot, *Physique et biophysique*, vol 2 "Électricité, électrophysiologie, électronique", Ed Masson et Cie, Paris, 1973
45. Gremy F, Perrin J, *Elements de biophysique*, vol 1 -2, Flammarion, Paris 1971
46. Guyton AC, Hall JE, *Textbook of Medical Physiology,* 9th ed, WB Saunders Company, USA, 1996
47. Hamill OP, Martinac B, Molecular basis of mechanotransduction in living cells, *Physiol Rev*, 2001, 81, 685-740
48. Harrison R, Lunt GG, *Biological Membranes,* Second ed, Blackie, Glasgow and London,1975
49. Hartwell LH, Hopfiel JJ, Leibler S, Murray AW, From molecular to modular cell biology, *Nature*, 1999, suppl vol 402, 6761, C47-C52
50. Hille B, *Ionic channels of excitable membranes,* second edition, Sinauer Associated, New York, 1992
51. Hille B, Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors, *Trends Neurosci,* 1994, 17, 531-537
52. Hoppe W, Lohmann W, Markl H, Ziegler H, *Biophysics,* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1982
53. Houslay MD, Stanley KK, *Dynamics of Biological Membranes – Influence on Synthesis, Structure and Function,* John Wiley & Sons Ltd, USA, 1982
54. Hurez D, *L'immunoélectrophorèse*, Les monographies CHOAY, Paris, 1991
55. Idu S M, Câmpeanu S, *Electroforeza*, Ed Medicală, Bucureşti, 1957
56. Isac M, Filipescu C, Isac R M, *Biofizica - De la Big-Bang la ecosisteme*, Vol 1, Ed Tehnică, Bucuresti, 1996
57. Joffre M, *Electrophysiologie moléculaire*, vol I - *La technique du patch clamp,* vol II - *Propriétes, structure moléculaire et rôle physiologiques des canaux ioniques*, Hermann, Paris, 2001
58. Kamoun, *Appareils et méthodes en biochimie*, Éd Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1977
59. Kane J, Sternheim M, *Physique*, InterEditions, Paris, 1986
60. Kendric C Smith; The Photobiological Basis of Low Level Laser Radiation Therapy, The Photobiological Basis of Low Level Laser Radiation Therapy, Stanford University School of Medicine, *Laser Therapy*, 3, 1, 1991
61. Korach G, Munier T, Vignand J, *Manuel des techniques de l'Imagerie par Résonance Magnétique*, Masson, 1993

62. Lakowicz, J R, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, London, 1983
63. Lester HA, Dougherty DA, New views of multi-ion channels, *J Gen Physiol,* 1998, 111, 181-183
64. Leterrier F, Gary-Bobo, C, *Biologie membranaire - Structure et dynamique des membranes biologiques*, Hermann, éditeurs des Sciences et des Arts, Paris, 1989
65. Levin RJ, *The Living Barrier : A Primer on Transfer across Biological Membranes,* Heinemann, London, 1969
66. Levitzki A, Receptors, *A Quantitative Approach*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, 1984
67. Liehn JC, Schvartz C, Les particularités de l'image scintigraphique, *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 1999, 23, 1, 3-8
68. Luca E, *Analiza structurală prin metode fizice*, Ed Academiei, Bucureşti, 1984
69. Machlup S, Hoshiko T, *Short-circuit current overshoot in epithelial sodium channels following apical sodium jump,* Biochim Biophys Acta, 1194, 1994, 303-314
70. Magne J, Magne-Marty R-M, *Biophysique*, PCEM1 – PCEM2, Ellipses, Paris, 1990
71. Mărgineanu DG, Isac M I, Tarba C, *Biofizică*, Ed Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980
72. Mincu I, Ionescu-Târgovişte C, *Stările hiperosmolare*, Editura Ştiinţifică, Bucureşti, 1974
73. Moore DH, *Physical Techniques in Biological Research,* Acad Press, New York, 1968
74. Mourou G, Umstadter D, Les lasers ultra-intenses, *Pour La Science, Hors-Series*, 298, 2002, 82 – 90
75. Mundy GR, Mechanisms of bone metastasis, *Cancer*, 80, 1997, 1546-1556
76. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, *Harper's Biochemistry,* Prentice-Hall International Inc, USA,1990
77. Nave CR, Nave BC, *Physics for the Health Sciences,* WB Saunders Company Philadelphia, USA, 1980
78. Nicolson GL, Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites, *Biochim Biophys Acta*, 1988, 948, 175-224
79. Nossal R, Lecar H, *Molecular & Cell Biophysics,* Addison-Wesley Publishing Company, USA, 1991
80. Olivier H R, *Traité de Biologie Appliquée*, Librairie Maloine S A, Paris, 1961
81. Paycha F, Indications oncologiques de la médecine nucléaire en 1999, *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique*, 1999, 23, 1, 8-12
82. Petty HR, *Molecular Biology of Membranes : Structure and Function*, Plenum Press, New York, 1993
83. Pogany I, Banciu M, *Tehnici experimentale în chimia organică*, Ed Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1977
84. Popescu A, *Fundamentele biofizicii medicale*, vol 1, Ed All, 1994
85. Poste G, Nicolson GL, *The Synthesis, Assembly and Turnover of Cell Surface Components*, Elsevier, Amsterdam, 1977
86. Reid E, Williamson R, *Centrifugation* in *Methods in Enzymology*, vol XXXI: Biomembranes, part A, Ed S Fleischer, L Parker, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1974
87. Rusu V, Baran T, Brănişteanu DD, *Biomembrane şi patologie*, vol I, Editura Medicală, Bucureşti, 1988
88. Rusu V, Baran T, Brănişteanu DD, *Biomembrane şi patologie*, vol II, Editura Medicală, Bucureşti, 1991
89. Rusu V, *Dicţionar medical*, Editura Medicală, Bucureşti, 2001
90. Rusu V. si colab, *Lucrări practice de Biofizică şi Fizică medicală*, Ed. Gr.T.Popa, Iaşi 2003.
91. Sakmann B, Neher E, *Single channell Recording*, Plenum Press, New York-London, 1995
92. Scars F W, Zernansky M W, Young H D, *Fizică*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1983
93. Schwedt G, *Atlas de poche des méthodes d'analyse*, Médicine – Sciences Flammarion, Paris, 1993
94. Scripcaru G, Covic M, Ungureanu G, *Electrocardiografie*, Ed Didactică şi Pedagogică, R A, Bucureşti, 1993,

95. Şerban M, Câmpeanu G, Ionescu E, *Metode de laborator în biochimia animală*, Ed Didactică şi Pedagogică RA, Bucureşti, 1993
96. Shechter E, Rossignol B, *Biochimie et biophysique des membranes,* 2e édition, Dunod, Paris, 2000
97. Shepard MC, Franklyn JA, *Clinical Endocrinology and Metabolism, 10 (1), Membrane Surface Receptors,* Bailliere Tindall, Cambridge, 1996
98. Sperelakis N, *Cell Physiology Source book,* second ed, Academic Press, San Diego-London-Boston, 1998
99. Steeg PS, Invasion and metastasis, *Current Opinions in Oncology*, 1992, 4, 134-141
100. Ştefanescu C., Grierosu I. *Biofizică şi Fizică medicală (pentru studenţii anului I Facultatea de Medicina)*, Ed. "Gr.T.Popa" 2014.
101. Ştefanescu C. si colab. *Exerciţii şi aplicaţii de Biofizică medicală (pentru studenţii anului I Facultatea de Medicina)*, Ed. "Gr.T.Popa" 2003.
102. Ştefanescu C., Rusu V. *De la fizica si biofizica radiofarmaceuticelor la imagini functionale si metabolice*, Ed. Tehnopress, Iaşi, 2007.
103. Ştefanescu C., Rusu V. Medical Biophysics. An introduction for students, Ed. Tehnopress, Iaşi, 2008.
104. Strohl A, *Precis de Physique Médicale*, Masson, Paris, 1957
105. Stryer L, *Biochemistry,* WH Freeman and Company, New York, 1988
106. Sybesma C, *Biophysics, an introduction,* Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1989
107. Taylor D L, Salmon E D, *Basic Fluorescence Microscopy – Methods in Cell Biology*, Eds Wang Y-L, Taylor D L, Academic Press, New York, 1989
108. Ti Tien H, Leitmannova AO, *Membrane Biophysics,* Elsevier, Amsterdam – New York, 2000
109. Tobin AJ, Morel R, *Asking about Cells,* Saunders College Publishing, USA, 1997
110. Trisch D, Chesnoy-Marchais D, Feltz A, *Physiologie du neurone*, Doin, Paris, 1998
111. Volkenshtein MV, *Biophysics,* Mir Publishers, Moscow, 1983
112. Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, Voltage-gated sodium channels and the molecular pathogenesis of pain: a review, *J Rehabil Res Dev,* 2000, 37, 5, 517-528
113. Weiss L, Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during hematogenous metastasis, *Cancer Metastasis Rev*, 1992, 11, 227-235
114. Weiss TF, *Cellular Biophysics, I-II,* The MIT Press, Massachusetts, 1996
115. Weissmann G, Claiborne R (ed), *Cell Membranes - Biochemistry, Cell Biology & Pathology,* HP Publishing Co, Inc, New York, 1975
116. Wilson K, Walker J (ed), *Principles an Techniques of Practical Biochemistry*, 5th ed, Cambridge University Press, UK, 1997
117. *Zaidel AN, Tehnica şi practica spectroscopiei*, Ed Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1984
116. *Compediu de fizică*, Ed Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti,1988
117. Consiliul Naţional de Protecţie Radiologică din Marea Britanie, *Trăim cu radiaţii*, EdTehnică, Bucureşti, 1989
118. http://biowinonamsusedu/ ILLUST/jpg
119. http://hplcchemshuedu/BOOK/xframpdf
120. http://usercncom/jkimballmaultranet/BiologyPagesPDF
121. http://wwwanlgov/ logos18-2/genome2PDF
122. http://wwwapsorg/BAMAR98PDF
123. http://wwwchemuwaeduau
124. http://wwwfstrdgacuk /460pdf
125. http://wwwgooglecom/searchlyophilisation.gif
126. http://wwwmicroscopyucom/museum/e600polhtml
127. http://www.itg.uc.edu/exhibits/gallery/pages/image.html
128. http://www.microscyu.com/articles/optics/objectivespecial.html
129. http://www.nobel/educ/microscopes/gallery/index.html
130. www.nanomedicine.com
131. https://www.dw.com/en/covid-19-nanomachines-to-be-deployed-to-fight-next-viral-pandemic/a-53267436

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

Cipriana **ȘTEFĂNESCU**

Profesor universitar dr. Cipriana ȘTEFĂNESCU
Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie *"Grigore T. Popa"* Iași,
Coordonator Disciplină de Biofizică și Fizică medicală - Facultatea de Medicină
Medic primar Medicină Nucleară și Endocrinologie.

Valeriu **RUSU**

Profesor universitar dr. Valeriu RUSU
A fost coordonator al Disciplinei de Biofizică și Fizică medicală - Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie *"Grigore T. Popa"* Iași timp de aproape 20 de ani, precum și Șef laborator Medicină nucleară pentru laboratorul care astăzi îi poartă numele.

Irena **GRIEROSU**

Șef lucrări dr. Irena GRIEROSU
Disciplină de Biofizică și Fizică medicală - Facultatea de Medicină, Universitatea de Medicină și Farmacie *"Grigore T. Popa"* Iași
Medic primar Medicină Nucleară.

Această carte își propune, pornind de la programa disciplinei, să dezvolte abilitatea viitorului medic de a realiza conexiuni logice, prin înțelegerea unor mecanisme biofizice caracteristice structurilor vii și unor metode utilizate pentru studiul acestora. Cartea este o traducere actualizată, în raport cu progresele în acest domeniu extrem de dinamic, a cursului pentru seria de limba engleză, a acelorași autori (primii doi), apărut în 2008.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN: 978-606-544-746-2